

Untersuchungen zum Mechanismus der Nährstoff- induzierten Insulinsekretion

Vom Fachbereich für Chemie und Pharmazie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von
Karin Urban
aus
Helmstedt

1. Referent:	Prof. Dr. med. U. Panten
2. Referent:	Prof. Dr. med. I. Rustenbeck
eingereicht am:	29.09.2005
mündliche Prüfung (Disputation) am:	12.12.2005
Druckjahr:	2005

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs für Chemie und Pharmazie, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Heissig H, Urban KA, Hastedt K, Zünkler BJ, Panten U (2005): Mechanism of the insulin-releasing action of α -ketoisocaproate and related α -keto acid anions. *Mol Pharmacol* 68(4): 1097-1105

Urban KA, Panten U (2005): Selective loss of glucose-induced amplification of insulin secretion in pancreatic islets pretreated with sulfonylurea in the absence of fuels. *Diabetologia* 48(12): 2563-2566

Tagungsbeiträge

Schmeling H, Urban KA, Hastedt K, Panten U: Direct inhibition of K_{ATP} -channels in β -cells by α -ketomonocarboxylic acids. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367 (Suppl. 1): R75, 288. 44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März 2003.

Urban KA, Schmeling H, Hastedt K, Panten U: Why is α -ketoisocaproic acid a stronger insulin secretagogue than glucose and other fuels? *Diabetes und Stoffwechsel* 12 (Suppl. 1): 3, V-7. 38. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Bremen, Mai 2003.

Urban KA, Panten U: Comparison of the insulin-releasing properties of glucose and α -ketoisocaproic acid. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369 (Suppl. 1): R71, 282. 45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März 2004.

Urban KA, Panten U: Comparison of the insulin-releasing effects of α -ketoisocaproic acid and α -ketoisovaleric acid. *Diabetes und Stoffwechsel* 13 (Suppl. 1): 126, P-272. 39. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Hannover, Mai 2004.

Urban KA, Heissig H, Panten U: Insulin-releasing actions of α -ketoisocaproate and related α -keto acid anions. 8. Deutscher Insel-Workshop der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Goslar, April 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2002 bis September 2005 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig angefertigt.

Herrn Prof. Dr. med. U. Panten danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung und die hilfreiche und stets freundliche Betreuung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau G. Henze-Wittenberg für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente zur Insulinsekretion und ATP-Bestimmung. Mein Dank gilt auch Frau C. Bleck, Frau V. Lier-Glaubitz und Frau I. Thomsen für die Unterstützung bei der Inselisolierung, sowie Frau H. Arend, Frau C. Schulze und Frau I. Tunger in der Tierhaltung. Herrn Prof. Dr. med. I. Rustenbeck danke ich für die Bereitstellung des Mikrotiterplatten-Photometers und Frau K. Hatlapatka für die Einarbeitung in die ATP-Bestimmung.

Ganz herzlich danke ich allen meinen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, die zu dem ausgezeichneten Arbeitsklima beigetragen haben.

INHALT

1	EINLEITUNG	1
1.1	Diabetes mellitus Typ 2 - Definition und Therapie	1
1.2	Insulinsekretion durch die β -Zelle des Pankreas	3
1.2.1	Mechanismus des auslösenden Weges	4
1.2.2	Hypothesen zum verstärkenden Weg	5
1.3	Wirkung von α -Ketomonocarbonsäuren und BCH auf die Insulinsekretion	8
2	ZIELSETZUNG	10
2.1	Mechanismus der α -Ketomonocarbonsäure-induzierten Insulinsekretion	10
2.2	Mechanismus der Nährstoff-induzierten Verstärkung der Insulinsekretion	11
3	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	Allgemeines	12
3.1.1	Chemikalien	12
3.1.2	Tiere	12
3.1.3	Basismedium	12
3.1.4	Inselisolierung	14
3.1.4.1	Medium für die Inselisolierung	14
3.1.4.2	Durchführung der Inselisolierung	14
3.2	Perifusion isolierter Maus-Pankreasinseln	15
3.2.1	Prinzip	15
3.2.2	Lösungen	15
3.2.2.1	Kontrollmedien	15
3.2.2.2	Testmedien	16
3.2.3	Durchführung	17
3.2.3.1	Perifusion	17
3.2.3.2	Bestimmung des Insulingehaltes	18
3.2.4	Darstellung der Ergebnisse	19
3.3	Bestimmung der Aktivität der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase	19
3.3.1	Prinzip	19
3.3.2	Lösungen	19

3.3.2.1	Grundmedien	19
3.3.2.2	Stammlösungen	20
3.3.2.3	Testlösungen	20
3.3.2.4	Kontrolllösung	21
3.3.3	Durchführung der Enzymbestimmung	21
3.3.4	Darstellung der Ergebnisse	21
3.4	Bestimmung des ATP- und ADP-Gehaltes in Maus-Pankreasinseln	22
3.4.1	Prinzip	22
3.4.2	Lösungen	22
3.4.2.1	Grundmedien	22
3.4.2.2	Kontrollmedien	22
3.4.2.3	Testmedien	22
3.4.2.4	Standardlösungen	23
3.4.2.5	Reagenzien	23
3.4.3	Durchführung	24
3.4.3.1	Inkubation und Extraktion	24
3.4.3.2	ATP- und ADP-Bestimmung	24
3.4.4	Darstellung der Ergebnisse	25
3.5	Statistische Analyse	25
4	ERGEBNISSE	26
4.1	Einfluss von Monocarbonsäuren auf die Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln	26
4.1.1	K _{ATP} -Kanal-unabhängige Stimulation der Insulinsekretion durch Monocarbonsäuren bei Abwesenheit eines anderen Substrates	26
4.1.2	K _{ATP} -Kanal-unabhängige Stimulation der Insulinsekretion durch Monocarbonsäuren bei Anwesenheit von 10 mM Glucose	29
4.1.3	Stimulation der Insulinsekretion bei Abwesenheit von Glucose und Glipizid	30
4.1.4	Stimulation der Insulinsekretion bei Anwesenheit von 10 mM Glucose und Abwesenheit von Glipizid	32
4.1.5	Einfluss von Meglitinid auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion	33
4.1.6	Einfluss von TEA auf die Insulinsekretion	35
4.1.7	Hemmung der α -Ketomonocarbonsäure-induzierten Insulinsekretion durch AOA	36
4.1.8	Hemmung der KIC-induzierten Insulinsekretion durch D-600	38
4.1.9	Einfluss von Glucagon auf die KIC-induzierte Insulinsekretion	39

4.2 Wirkung von Monocarbonsäuren auf die α-Ketoglutarat-Dehydrogenase	40
4.3 Selektive Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion bei Anwesenheit des Sulfonylharnstoffs Glipizid	43
4.3.1 Vergleich der sekretionssteigernden Wirkung von Glucose und KIC	43
4.3.2 Vergleich der sekretionssteigernden Wirkung von KIC, BCH und MMS bei Anwesenheit von Glipizid	45
4.3.3 Wirkung von Glucose und KIC auf den Gehalt von ATP und ADP in Maus-Pankreasinseln	47
5 DISKUSSION	49
5.1 Direkte Wirkungen der α-Ketomonocarbonsäuren auf die K_{ATP}-Kanäle der β-Zelle und andere Strukturen der Maus-Pankreasinsel	49
5.1.1 Direkte Hemmung der K_{ATP} -Kanäle der β -Zelle	49
5.1.2 Beteiligung anderer Kalium-Kanäle der β -Zelle	51
5.1.3 Einfluss auf die Exocytose des Insulins	51
5.1.4 Einfluss auf die Glucagon-Freisetzung	52
5.2 Verstärkende Effekte der α-Ketomonocarbonsäuren auf die Insulinsekretion	52
5.2.1 Transaminierung und Bildung von α -Ketoglutarat	53
5.2.2 Abbau der α -Ketomonocarbonsäuren und Bildung von Acetyl-CoA	54
5.2.3 Bedeutung des Citratcyclus	56
5.3 Gesamteffekte der α-Ketomonocarbonsäuren auf die Insulinsekretion	58
5.4 Wirkung von Glucose auf die α-Ketomonocarbonsäure-induzierte Insulinsekretion	60
5.5 Selektive Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion bei Anwesenheit des Sulfonylharnstoffs Glipizid	61
6 ZUSAMMENFASSUNG	63
6.1 Mechanismus der α -Ketomonocarbonsäure-induzierten Insulinsekretion	63
6.2 Mechanismus der Nährstoff-induzierten Verstärkung der Insulinsekretion	64
7 LITERATUR	66
8 ABKÜRZUNGEN	74

1 EINLEITUNG

1.1 Diabetes mellitus Typ 2 - Definition und Therapie

Diabetes mellitus ist eine irreversible Stoffwechselerkrankung, die immer dann vorliegt, wenn die Blutglucosekonzentration ohne Therapie auf Dauer pathologisch erhöht ist. Es werden vier Hauptgruppen von Diabetes mellitus unterschieden (SCHERBAUM, 2001):

A Diabetes mellitus Typ 1

Der Diabetes mellitus Typ 1 kommt durch autoimmunologischen Untergang aller Insulin-produzierenden β -Zellen zustande. Daher besteht ein absoluter Insulinmangel. Dieser Diabetes Typ tritt meistens im jugendlichen Alter auf und liegt in Deutschland bei 6 bis 7 % aller Patienten mit Diabetes mellitus vor.

B Diabetes mellitus Typ 2

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist durch eine Insulinsekretion charakterisiert, die nicht ausreicht, den Insulinbedarf zu decken (relativer Insulinmangel). Es handelt sich um eine Anpassungsschwäche der β -Zellen, die sich vor allem dann zeigt, wenn die Wirksamkeit des körpereigenen Insulins an den Zielgeweben herabgesetzt ist (Abnahme der Insulinsensitivität; Insulinresistenz). Die Anpassungsschwäche der β -Zellen ist wahrscheinlich größtenteils angeboren, während die Insulinresistenz überwiegend durch Adipositas und Bewegungsmangel erworben ist (SZOKE und GERICH, 2005). Der Diabetes mellitus Typ 2 tritt meistens nach dem 40. Lebensjahr auf und liegt in Deutschland bei etwa 90 % aller Patienten mit Diabetes mellitus vor.

C Andere Diabetesformen

Als dritte Gruppe werden die Diabetesformen zusammengefasst, bei denen im Gegensatz zu den Diabetes Typen 1 und 2 die eigentlichen auslösenden Ursachen genau bekannt sind. Hierzu gehören z. B. Diabetes mellitus durch identifizierte Gendefekte der β -Zellen und des Insulinrezeptors, Diabetes mellitus nach totaler Pankreatektomie und Diabetes mellitus durch Glucocorticoide.

D Gestationsdiabetes

Als Gestationsdiabetes wird ein Diabetes mellitus bezeichnet, der erstmals in der Schwangerschaft auftritt oder diagnostiziert wird. Durch Schwangerschaftshormone, wie z. B. Progesteron, wird ein vermehrter Insulinbedarf hervorgerufen, der nicht bei allen Schwangeren durch Steigerung der Insulinsekretion vollständig kompensiert werden kann. In den meisten Fällen verschwindet der Gestationsdiabetes nach der Entbindung. Beim Gestationsdiabetes handelt es sich also um eine Anpassungsschwäche der β -Zellen. Dies erklärt auch, dass bei den betroffenen Frauen in späteren Jahren ein gehäuftes Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 beobachtet wird.

Alle Diabetesformen führen zu Spätkomplikationen, die durch Gefäßerkrankungen entstehen und die Lebenserwartung und Lebensqualität vermindern.

Die nicht diagnostizierten Fälle einbezogen, sind derzeit in Deutschland etwa 7 % der Erwachsenen an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt, bei fortschreitendem Anstieg der Inzidenz. Dies resultiert vor allem aus der starken Zunahme von Adipositas und Bewegungsmangel.

Für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 gibt es verschiedene Optionen (HÄRING und MATTHAEI, Praxis Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft 2002). Am Anfang steht eine Umstellung der Lebensgewohnheiten hin zu gesunder Ernährung und verstärkter Bewegung sowie gegebenenfalls die Reduktion des Körpergewichtes. Wird mit diesen nicht-medikamentösen Maßnahmen keine zufriedenstellende Einstellung des Blutzuckerspiegels erreicht, so werden orale Antidiabetika eingesetzt. Wird auch mit diesen Medikamenten kein ausreichender Therapieerfolg mehr erzielt, muss auf die Therapie mit Insulin umgestellt werden.

Die Vielfalt der Angriffspunkte der oralen Antidiabetika spiegelt die Komplexität der Pathophysiologie wider.

A Reduktion der Glucose-Resorption bzw. -Neubildung

(PANTEN und RUSTENBECK, 2005)

Die α -Glucosidase-Hemmstoffe, z. B. Acarbose, verzögern die Resorption von Glucose aus dem Dünndarm. Sie hemmen kompetitiv intestinale α -Glucosidasen und verringern somit die Spaltung von Disacchariden.

Das Biguanid Metformin reduziert vorwiegend die hepatische Gluconeogenese.

B Verstärkung der Insulinsensitivität der Zielzellen des Insulins

(PANTEN und RUSTENBECK, 2005)

Die Insulinsensitizer (derzeit in Deutschland zugelassen sind Rosiglitazon und Pioglitazon) aktivieren den intranukleären Transkriptionsfaktor PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor, Subtyp γ). Sie greifen vor allem an Fettzellen an. Diese Zielzellen des Insulins speichern dann unter anderem mehr Triglyceride und geben weniger Hyperglykämie-fördernde Produkte ab. Zur Blutzuckersenkung tragen wahrscheinlich auch direkte Effekte der Insulinsensitizer auf PPAR γ von Muskel- und Leberzellen bei.

C Verstärkung der Insulinsekretion durch die β -Zelle des Pankreas

(PANTEN und RUSTENBECK, 2005)

Bestimmte Sulfonylharnstoffe, z. B. Glibenclamid, steigern die Insulinsekretion durch die β -Zelle des Pankreas, indem sie deren ATP-abhängige Kalium-Kanäle (K_{ATP}-Kanäle) blockieren. Ein Problem dabei ist, dass sie nicht nur bei Hyperglykämie sekretionssteigernd wirken und daher Hypoglykämie auslösen können. Die neueren Sulfonylharnstoff-Analoga (Repaglinid, Nateglinid) unterscheiden sich von den Sulfonylharnstoffen durch eine kürzere Wirkdauer.

D neue Ansätze

Der erste zur Therapie zugelassene (in den USA) Vertreter der neuen Antidiabetika-Klasse der Inkretin-Mimetika ist Exenatide (synthetisches Exendin-4). Das subcutan zu injizierende Analogon des intestinalen Peptidhormons Glucagon-like-peptide-1 (GLP-1) greift auf verschiedenen Ebenen ein (MEIER und NAUCK, 2005): Durch Angriff an den β -Zellen wird die Glucose-induzierte Insulinsekretion verstärkt (dabei besteht keine Hypoglykämiegefahr), die Insulinbiosynthese gesteigert und wahrscheinlich auch die Anzahl der β -Zellen vermehrt. Ferner werden Glucagonsekretion, Magenentleerung und Appetit gehemmt.

Am Beginn der klinischen Entwicklungsphase stehen Aktivatoren der Glucokinase (GRIMSBY et al., 2003; BROCKLEHURST et al., 2004; EFANOV et al., 2005). Die Aktivierung der Glucokinase der β -Zellen und Leberzellen senkt den Blutglucosespiegel auf verschiedenen Wegen: Erstens wird die Glucose-induzierte Insulinsekretion der β -Zellen gesteigert und zweitens wird in der Leber die Aufnahme von Glucose gefördert und die Gluconeogenese gesenkt.

Trotz dieser vielfältigen Therapieoptionen ist es bei vielen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 nicht möglich, ohne Insulin-Injektion eine ausreichende Blutzuckerkontrolle zu erreichen. Um weitere β -Zell-stimulierende Antidiabetika mit neuen Angriffspunkten zu entwickeln, ist es notwendig, die Mechanismen der Insulinsekretion durch die β -Zelle des Pankreas genau zu kennen.

1.2 Insulinsekretion durch die β -Zelle des Pankreas

Das Pankreas gliedert sich funktionell in den exokrinen Teil, der das Verdauungsssekret produziert, und den endokrinen Teil, der die Hormone an das Blut abgibt (THEWS et al., 1999). Histologisch spiegelt sich diese Unterteilung wider in dem großen, stark verzweigten exokrinen Teil und dem nur ca. 2 – 3 % der Gesamtmasse einnehmenden endokrinen Teil, den Langerhans-Inseln. Diese ca. 1 Mio. Inseln bestehen jeweils aus etwa 3000 Zellen. Ungefähr 70 % der Zellen einer Insel sind Insulin-produzierende β -Zellen. Sie sind hauptsächlich im Zentrum der Insel lokalisiert. Vorwiegend am Rand der Insel befinden sich Glucagon-produzierende α -Zellen, die etwa 20 % der Inselzellen ausmachen. Die restlichen 10 % der Inselzellen sind Somatostatin-produzierende δ -Zellen und pankreatisches Polypeptid-produzierende PP-Zellen (THEWS et al., 1999).

Die β -Zellen sind die einzigen Zellen im Organismus, die physiologischerweise in der Lage sind, Insulin zu bilden und freizusetzen. Der physiologische Hauptstimulus für die Insulinsekretion durch die β -Zelle des Pankreas ist Glucose. Daneben stimulieren auch Aminosäuren, ihre Transaminierungsprodukte, die α -Ketosäuren, und Fettsäuren die Insulinfreisetzung. Auch hormonelle (Glucagon, GLP-1, Somatostatin) und neuronale (Acetylcholin, Noradrenalin) Faktoren beeinflussen die Insulinsekretion (PANTEN und RUSTENBECK, 2005).

1.2.1 Mechanismus des auslösenden Weges

Glucose wird über GLUT-2-Transporter in die β -Zelle aufgenommen (Abb. 1.1) und im Cytosol zunächst unter ATP-Verbrauch phosphoryliert. Dieser Schritt wird durch das Enzym Glucokinase katalysiert, das als Glucosesensor wirkt. Mit ~ 10 mM hat die Glucokinase einen hohen K_m -Wert für Glucose, sodass in der β -Zelle die Rate der Glucosephosphorylierung der Blutglucosekonzentration entspricht (MATSCHINSKY, 1996). Dies ist möglich, weil die GLUT-2-Transporter in der β -Zell-Plasmamembran in hoher Konzentration vorliegen und eine relativ niedrige Affinität zu Glucose aufweisen ($K_m \sim 40$ mM). Daher wird der Glucose-transport für den Glucosemetabolismus nicht limitierend (LÖFFLER, 1997a und 1997d). Im weiteren Verlauf von Glykolyse, Citratcyclus und Atmungskette wird die Glucose unter Bildung von Reduktionsäquivalenten und schließlich ATP metabolisiert. Die ATP-Produktion in der β -Zelle korreliert daher mit der Glucose-Konzentration im Blut. Die erhöhte ATP-Konzentration und die damit einhergehende Verringerung der ADP-Konzentration im Cytosol führen zum Schließen ATP-abhängiger Kalium-Kanäle (K_{ATP} -Kanäle) in der β -Zell-Plasmamembran (ASHCROFT, 1988).

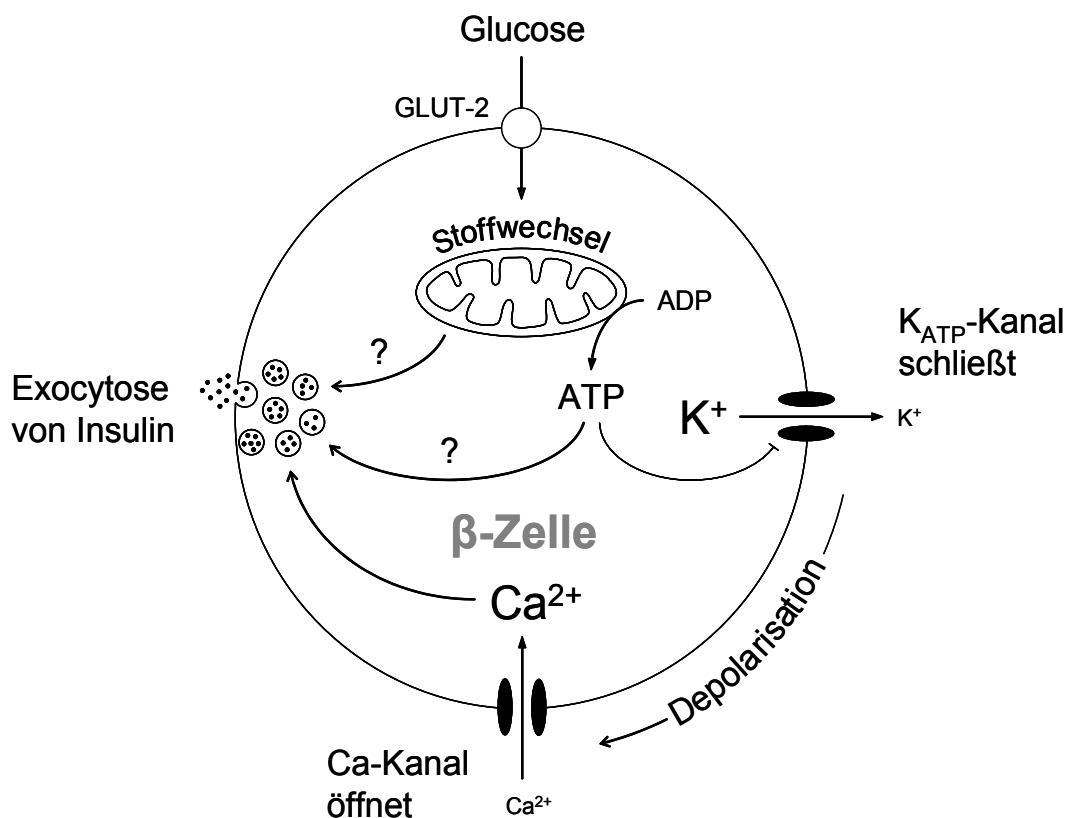


Abb. 1.1 Stimulation der Insulinsekretion durch die β -Zelle des Pankreas. Glucose wird durch GLUT-2-Transporter in die β -Zelle aufgenommen. Über Glykolyse, Citratcyclus und Atmungskette wird sie metabolisiert und steigert letztendlich die Bildung von ATP aus ADP. Die Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses führt zur Schließung von ATP-abhängigen Kalium-Kanälen. Aufgrund der resultierenden Depolarisation der β -Zell-Membran öffnen sich spannungsabhängige Calcium-Kanäle, und es kommt zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Diese ist das entscheidende Signal für das Auslösen der Exocytose des in Vesikeln gespeicherten Insulins. Neben diesem auslösenden Weg gibt es weitere bisher noch nicht identifizierte Mechanismen (durch ? gekennzeichnet), die das Ausmaß der Sekretion steigern können (HENQUIN, 2000).

Der K_{ATP} -Kanal der pankreatischen β -Zelle ist aus einer porenbildenden Untereinheit, $K_{IR6.2}$, und einer regulatorischen Untereinheit, SUR1, zusammengesetzt (AGUILAR-BRYAN und BRYAN, 1999). Beide Untereinheiten liegen als Tetramer vor. ATP schließt durch Bindung an die Untereinheit $K_{IR6.2}$ den Kanal, während MgADP den Kanal durch Bindung an SUR1 öffnet. Ebenfalls an SUR1 binden Sulfonylharnstoffe und ihre Analoga und schließen auf diese Weise den K_{ATP} -Kanal. Ihre Bindungsstelle, die nicht mit der für MgADP identisch ist, befindet sich auf der cytosolischen Seite des K_{ATP} -Kanals (SCHWANSTECHEER et al., 1994; ASHFIELD et al., 1999).

Die K_{ATP} -Kanäle sind für die Ausbildung des Ruhepotentials der β -Zell-Membran verantwortlich. Werden sie geschlossen, kommt es zu einer Depolarisation der Membran. Dadurch öffnen sich spannungsabhängige Calcium-Kanäle der Membran und es strömen vermehrt Calcium-Ionen in das Cytosol (ASHCROFT und RORSMAN, 1989). Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration löst letztendlich die Exocytose des in Vesikeln gespeicherten Insulins aus (HENQUIN, 1987).

Diese Abfolge vom Glucosemetabolismus über den Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses, die Schließung der K_{ATP} -Kanäle, Depolarisation der Plasmamembran, Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle und den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bis zur Exocytose des Insulins wird als „auslösender Weg“ (triggering pathway) bezeichnet. Er ist Voraussetzung für die Freisetzung des Insulins (HENQUIN, 2000; WOLLHEIM, 2000). Sobald die Insulinsekretion auf diesem Weg ausgelöst worden ist, kann ihr Ausmaß über weitere bislang noch nicht eindeutig identifizierte metabolische Mechanismen gesteigert werden (Abb. 1.1). Diese Effekte werden unter dem Begriff „verstärkender Weg“ (amplifying pathway) zusammengefasst (HENQUIN, 2000).

1.2.2 Hypothesen zum verstärkenden Weg

Der verstärkende Weg wird auch als K_{ATP} -Kanal-unabhängiger Weg bezeichnet, da Glucose die Insulinsekretion auch bei vollständig geschlossenen K_{ATP} -Kanälen noch stimulieren kann (PANTEN et al., 1988). Auch bei SUR1-knockout Mäusen, deren β -Zellen keine öffnenden K_{ATP} -Kanäle besitzen und daher kontinuierlich Insulin freisetzen, steigert Glucose die Insulinsekretion noch weiter (SEGHERS et al., 2000).

Weitgehend akzeptiert ist eine Beteiligung des Metabolismus der Glucose an dem verstärkenden Weg. Welche einzelnen Mediatoren eine entscheidende Rolle spielen, ist jedoch noch unklar (SATO und HENQUIN, 1998; HENQUIN et al., 2003; LIU et al., 2003).

Die Bedeutung von Glutamat als Mediator des verstärkenden Weges (MAECHLER und WOLLHEIM, 1999) konnte in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden. Glucose steigerte dort zwar die Glutamat-Konzentration in Maus- und Ratteninseln unter Bedingungen, in denen auch die Insulinsekretion gesteigert wird. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Glutamat- und Insulinsekretionssteigerung konnte jedoch nicht festgestellt werden (MACDONALD und FAHIEN, 2000; BERTRAND et al., 2002).

Der für den auslösenden Weg der Insulinsekretion benötigte Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses, wird auch für den verstärkenden Weg als wahrscheinliches Signal angesehen (HENQUIN et al., 2003).

Neben Reduktionsäquivalenten und letztendlich ATP liefert der Abbau von Glucose auch verschiedene Intermediate, denen eine Bedeutung bei der Stimulation der Insulinsekretion zugesprochen wird (Abb. 1.2). Ein Intermediat des Citratcyclus, das wahrscheinlich an dem verstärkenden Weg der Insulinsekretion beteiligt ist, ist α -Ketoglutarat. Die Fähigkeit einzelner Nährstoffe zur Bereitstellung von α -Ketoglutarat korreliert mit ihrer Stärke der sekretionssteigernden Wirkung (LENZEN et al., 1986).

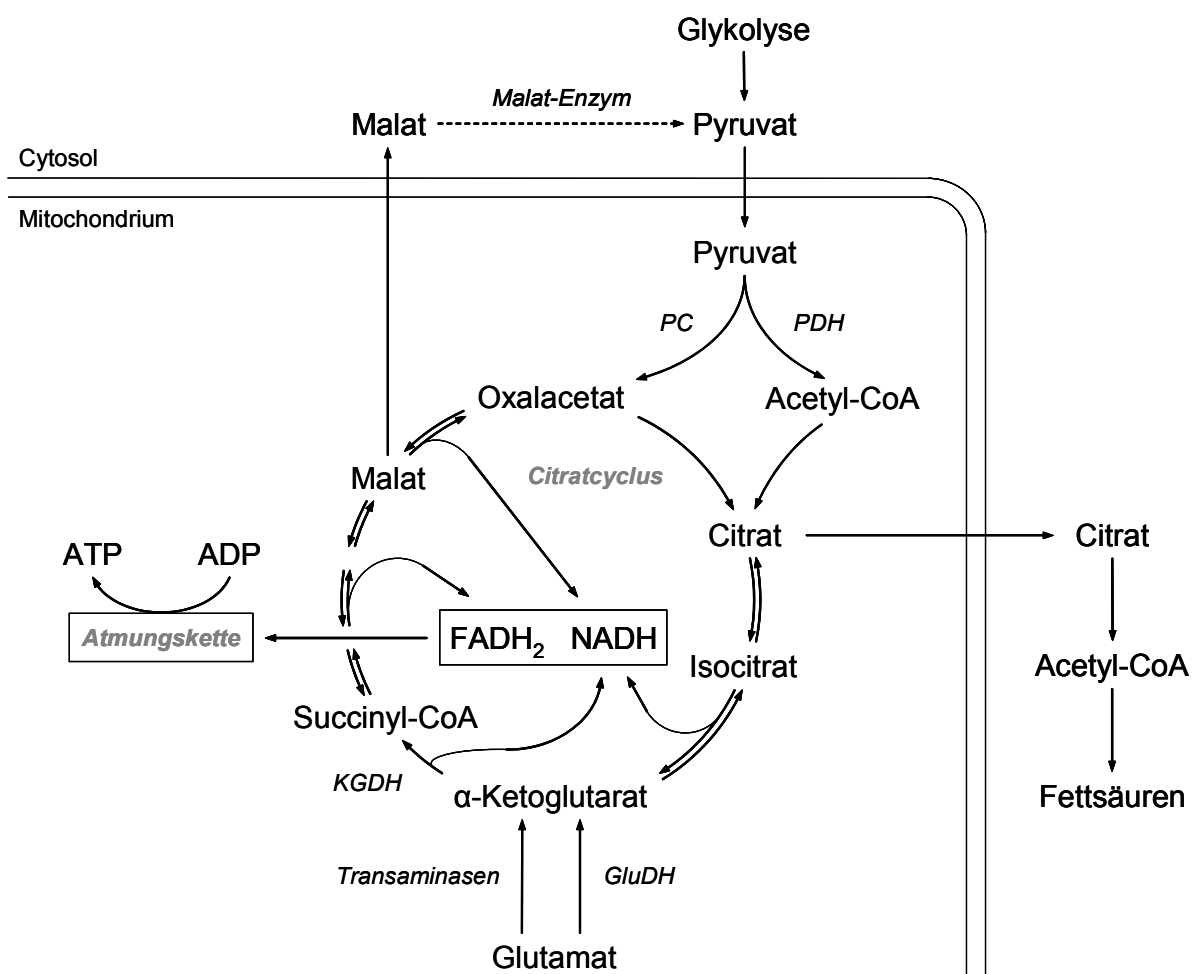


Abb. 1.2 Anaplerose und Kataplerose des Citratcyclus. Das aus Glucose in der Glykolyse gebildete Pyruvat tritt in das Mitochondrium ein und speist dort nach Metabolisierung zu Oxalacetat und Acetyl-CoA den Citratcyclus. Zusätzlich kann das Cyclus-Intermediat α -Ketoglutarat durch weitere Reaktionen aus Glutamat gebildet werden und die Aktivität des Cyclus steigern. Dadurch entstehen vermehrt Reduktionsäquivalente (NADH und FADH₂), die über die Atmungskette die Bildung von ATP aus ADP steigern. Andere Intermediate, wie z. B. Malat und Citrat, können das Mitochondrium verlassen und im Cytosol für weitere Stoffwechselreaktionen verwendet werden.

PC: Pyruvat-Carboxylase, PDH: Pyruvat-Dehydrogenase, KGDH: α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, GluDH: Glutamat-Dehydrogenase

Eine Reaktion zur Bildung von α -Ketoglutarat ist die oxidative Desaminierung von Glutamat (Abb. 1.2). Diese Reaktion wird durch das intramitochondriale Enzym Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) katalysiert, dessen Aktivierung die Insulinsekretion stimuliert (PANTEN und LANGER, 1981).

α -Ketoglutarat entsteht auch aus Glutamat bei der Transaminierung von Aminosäuren zu den entsprechenden α -Ketosäuren. Wird diese Transaminierung durch Aminooxyessigsäure (AOA), einen Transaminasen-Hemmstoff, gehemmt, so sinkt auch die Nährstoff-induzierte Insulinsekretion (MALAISSE et al., 1982).

Ein gesteigerter Zufluss an Citratcyclus-Intermediaten (Anaplerose) würde die Funktion des Cyclus jedoch beeinträchtigen, wenn die Anaplerose nicht durch vermehrten Abfluss von Citratcyclus-Intermediaten (Kataplerose) kompensiert würde (MACDONALD et al., 2005). Es gibt Hinweise, dass Kataplerose die Signale liefert, die die Nährstoff-induzierte Insulinsekretion verstärken (LIU et al., 2003; MACDONALD et al., 2005).

α -Ketoglutarat wird im Citratcyclus zu Succinyl-CoA umgewandelt (Abb. 1.2; LÖFFLER, 1997c). Diese Reaktion wird durch das Enzym α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH) katalysiert. Im weiteren Verlauf des Citratcyclus entsteht Malat, das das Mitochondrium verlassen kann. In den β -Zellen von Ratten kann es im Cytosol durch das Malat-Enzym zu Pyruvat umgesetzt werden. Dieses kann im Mitochondrium sowohl Oxalacetat (durch die Pyruvat-Carboxylase, PC) als auch Acetyl-CoA (durch die Pyruvat-Dehydrogenase, PDH) und somit Citrat bilden. In Maus-Pankreasinseln ist die Aktivität des Malat-Enzyms sehr gering (MACDONALD, 2002). Daher kann das Malat kaum zu Pyruvat umgewandelt werden. In diesem Fall ist zur Bildung von Citrat aus Oxalacetat daher die Zufuhr von zusätzlichem Acetyl-CoA notwendig. In Maus-Pankreasinseln kann α -Ketoglutarat jedoch auch durch Umkehrung der Isocitrat-Dehydrogenase- und Aconitase-Reaktionen zu Isocitrat und Citrat umgewandelt werden (Abb. 1.2; MACDONALD et al., 2005). Citrat wiederum kann aus dem Mitochondrium ausgeschleust werden und im Cytosol für weitere Stoffwechselreaktionen verwendet werden, z. B. zur Bildung von Acetyl-CoA, das für die Fettsäure-Synthese genutzt werden kann (Abb. 1.2; LÖFFLER, 1997b). Das dabei zunächst entstehende Malonyl-CoA hemmt wiederum den Fettsäure-Abbau. Die daraus resultierende Akkumulation langkettiger Fettsäure-CoA-Ester im Cytosol der β -Zelle könnte zur Insulinsekretion beitragen (CORKEY et al., 2000; STRAUB und SHARP, 2002). Untersuchungen mit Palmitat widersprechen jedoch dieser These (WARNOTTE et al., 1994).

1.3 Wirkung von α -Ketomonocarbonsäuren und BCH auf die Insulinsekretion

Bereits in den 1960er und 1970er Jahren wurde beschrieben, dass einige Aminosäuren und ihre Transaminierungsprodukte, die α -Ketosäuren, die Insulinsekretion der β -Zelle des Pankreas steigern (HELLMAN, 1967; PANTEN et al., 1972; MATSCHINSKY et al., 1973; PANTEN, 1975; LENZEN, 1978). Seitdem werden sie als Testsubstanzen eingesetzt, um die Mechanismen der Insulinsekretion zu untersuchen.

Die am besten untersuchte α -Ketomonocarbonsäure ist α -Ketoisocaproinsäure (KIC), das Transaminierungsprodukt von Leucin. Sie steigert die Insulinsekretion sowohl bei Anwesenheit als auch bei Abwesenheit weiterer Stimulatoren. Auch wenn die K_{ATP} -Kanäle der β -Zelle durch maximal wirksame Konzentrationen von Sulfonylharnstoffen vollständig blockiert sind, steigert KIC die Insulinsekretion, sogar stärker als Glucose (PANTEN et al., 1988; HASTEDT, 2003).

α -Ketocaproinsäure (KC), das Transaminierungsprodukt von Norleucin, steigert die Insulinsekretion in ähnlichem Ausmaß wie sein verzweigtes Isomer KIC. Die stimulatorische Wirkung ist ebenfalls unabhängig von der Anwesenheit eines weiteren Stimulators (MATSCHINSKY et al., 1973; PANTEN, 1975; LENZEN, 1978; HASTEDT, 2003).

β -Phenylpyruvat (PP), das Transaminierungsprodukt von Phenylalanin, zählt wie KIC und KC zu den Initiatoren der Insulinsekretion, da es ebenfalls bei Abwesenheit anderer Stimulatoren die Insulinsekretion steigert. Im Gegensatz zu KIC und KC ist die Sekretionssteigerung jedoch nur von kurzer Dauer (MATSCHINSKY et al., 1973; PANTEN, 1975; LENZEN, 1978; PANTEN und LANGER, 1981; HASTEDT, 2003).

α -Ketoisovaleriansäure (KIV), das Transaminierungsprodukt von Valin, kann die Insulinsekretion nur bei Anwesenheit eines anderen Stimulators steigern. Sie ist deutlich schwächer wirksam als PP, KC oder KIC (PANTEN et al., 1972; MATSCHINSKY et al., 1973; PANTEN, 1975; HASTEDT, 2003).

Ähnlich wie bei Glucose scheint der Metabolismus von KIC und verwandten α -Ketomonocarbonsäuren für ihre starke sekretionssteigernde Wirkung eine wichtige Rolle zu spielen (PANTEN et al., 1972). Durch den intramitochondrialen Abbau der α -Ketomonocarbonsäuren wird letztendlich die ATP-Produktion der β -Zelle gesteigert (HUTTON et al., 1979). Dies führt wie in Kapitel 1.2 beschrieben unter Vermittlung von K_{ATP} -Kanälen zur Freisetzung von Insulin. Wenn die K_{ATP} -Kanäle bereits durch Sulfonylharnstoffe vollständig geschlossen sind, können sie keine Insulinsekretionssteigerung als Antwort auf eine ATP-Erhöhung mehr vermitteln. Aber auch unter diesen Bedingungen können die α -Ketomonocarbonsäuren die Insulinsekretion noch steigern (HASTEDT, 2003). Der Anstieg der ATP-Konzentration in der β -Zelle könnte also noch über weitere Mechanismen die Insulinsekretionssteigerung vermitteln (HENQUIN et al., 2003).

Neben dem Abbau ist wahrscheinlich auch die Transaminierung der α -Ketosäuren mit Glutamat zu ihren entsprechenden Aminosäuren unter Bildung von α -Ketoglutarat für die sekretionssteigernde Wirkung von Bedeutung. Die Aminosäuren dienen einerseits ebenfalls durch ihren Abbau der Energiegewinnung. Daneben können sie aber auch direkte Effekte haben, die zur Stimulation der Insulinsekretion beitragen, z. B. die Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase. Diese eigenständige Wirkung der Aminosäuren wird gestützt durch die Beobachtung, dass BCH, ein nicht-metabolisierbares Leucin-Analogon, ebenfalls die Insulinsekretion steigert (CHRISTENSEN und CULLEN, 1969; PANTEN und CHRISTIANS, 1973; SENER und MALAISSE, 1980). Die starke sekretionssteigernde Wirkung von (-)-b-BCH, dem eigentlich wirksamen Isomer der 2-Aminobicyclo[2.2.1]heptan-2-carbonsäure, ist wahrscheinlich auf die starke Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase und die daraus resultierende Bildung von α -Ketoglutarat zurückzuführen (GYLFE, 1976; SENER und MALAISSE, 1980; PANTEN und LANGER, 1981; LIU et al., 2003).

Neben ihrer indirekten, metabolischen Wirkung durch Steigerung der ATP-Produktion und daraus resultierender Hemmung der K_{ATP} -Kanäle blockieren α -Ketomonocarbonsäuren die K_{ATP} -Kanäle auch direkt, indem sie an die regulatorische Untereinheit (SUR1) der K_{ATP} -Kanäle binden (BRÄNSTRÖM et al., 1998; SCHMELING, 2004). Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, welche Rolle dieser direkte Effekt bei der Stimulation der Insulinsekretion durch α -Ketomonocarbonsäuren spielt.

2.2 Mechanismus der Nährstoff-induzierten Verstärkung der Insulinsekretion

Die Nährstoff-induzierte Insulinsekretion der β -Zelle des Pankreas wird auf zwei verschiedenen Hauptwegen stimuliert, an denen der Metabolismus des Nährstoffes beteiligt ist. Für das Auslösen der Insulinsekretion ist die Bildung von ATP und das Schließen ATP-abhängiger Kalium-Kanäle von entscheidender Bedeutung. Für die Verstärkung der Insulinsekretion spielen noch unbekannte metabolische Mediatoren eine wichtige Rolle.

In meiner Arbeit sollte durch Bestimmung des ATP- und ADP-Gehaltes in isolierten Maus-Pankreasinseln untersucht werden, ob eine Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses auch an der Nährstoff-induzierten Verstärkung der Insulinsekretion beteiligt ist.

Es sollte auch geprüft werden, ob die Nährstoff-induzierte Verstärkung der Insulinsekretion durch Stimulation des Exports von Citratcyclus-Intermediaten in das Cytosol der β -Zelle erklärt werden kann. Dazu wurden die Kinetiken der Verstärker-Wirkungen von Glucose, KIC, BCH und MMS (Abb. 2.2) verglichen. BCH ist ein nicht-metabolisierbares Leucin-Analogon, das die α -Ketoglutarat-Produktion durch Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase steigert. Monomethylsuccinat (MMS) kann im Gegensatz zu Succinat, einem Intermediat des Citratcyclus, die Plasmamembran passieren, weil es weniger polar ist als Succinat. Im Zellinneren wird MMS dann durch Esterhydrolyse zu Succinat umgewandelt.

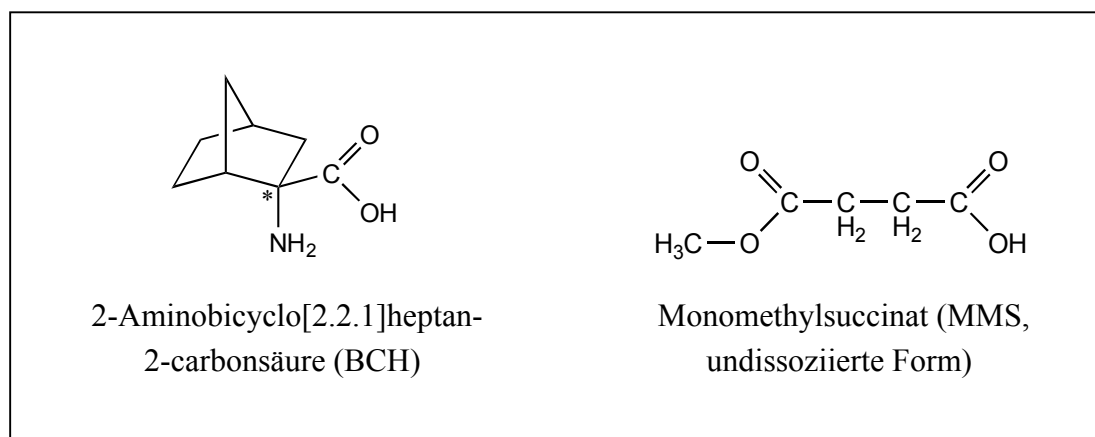


Abb. 2.2 Strukturformeln von BCH und MMS.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Allgemeines

3.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben wurden die Chemikalien (Reinheitsgrad „pro analysi“ (p. a.) oder „für die Molekularbiologie“) von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Merck oder Roth bezogen.

Für die Herstellung der Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, Aqua bidestillata verwendet.

3.1.2 Tiere

Bei den eingesetzten Tieren handelte es sich um NMRI-Albinomäuse beiderlei Geschlechts der Firmen Harlan Winkelmann (HsdWin:NMRI) und Charles River (CrI:NMRI), die in der Zentralen Einrichtung für Tierhaltung der TU Braunschweig gehalten und vermehrt wurden. Sie hatten freien Zugang zu Trinkwasser und dem Standard-Diätfutter Altromin 1324 (Fa. Altromin) und wurden in klimatisierten Räumen bei einer Temperatur von 25 °C gehalten. Zum Zeitpunkt der Pankreasentnahme waren die Mäuse zwischen 9 und 15 Wochen alt.

3.1.3 Basismedium

Sowohl für die Inselisolierung als auch für die Perifusion und die ATP-Bestimmung wurde als Basismedium ein modifiziertes Krebs-Ringer-Medium verwendet. Durch Zugabe des nicht flüchtigen HEPES-Puffers wurde der pH-Wert ausreichend konstant gehalten. Ohne HEPES-Zusatz wäre dies nur durch andauernde Begasung mit CO₂ möglich, da andernfalls entweichendes CO₂ zu einer Alkalisierung des Mediums führen würde (LERNMARK, 1974). Als weitere Modifikation enthielt die im Folgenden mit Krebs-Ringer-HEPES-Albumin-(KRHA)-Medium bezeichnete Lösung noch Albumin.

- A) Stammlösung 1: Natriumchlorid (0,9 %)*
- B) Stammlösung 2: Kaliumchlorid (1,15 %)*
- C) Stammlösung 3: Calciumchlorid-Dihydrat (1,62 %)*
- D) Stammlösung 4: Kaliumdihydrogenphosphat (2,11 %)*
- E) Stammlösung 5: Magnesiumsulfat-Heptahydrat (3,82 %)*
- F) Stammlösung 6: Natriumhydrogencarbonat (1,3 %)*

Die Lösung wurde nach der Herstellung 30 Minuten mit CO₂ begast.

G) Stammlösung 7: HEPES-Albumin-Lösung (7,74 % HEPES + 6,5 % Albumin)

32,5 g Rinderserumalbumin (Fraktion V, Pentex 81003, Bayer Diagnostics) wurden auf 200 ml Aqua bidest. gegeben und unter ständigem Rühren gelöst. In einem zweiten Ansatz wurden 38,7 g HEPES in 125 ml Aqua bidest. gelöst. Der pH-Wert dieser Lösung wurde durch Zugabe von 60 – 70 ml 1 N-NaOH auf 7,4 eingestellt. Nach Überführen der beiden Lösungen in einen 500 ml Messkolben wurde das Volumen mit Aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt.

Die Stammlösungen 1 bis 6 wurden bei 4 °C gelagert. Stammlösung 7 wurde in Aliquots abgefüllt und bei – 20 °C eingefroren.

An jedem Versuchstag wurde das Basismedium frisch aus den Stammlösungen 1 bis 7 hergestellt. Die Stammlösungen wurden auf Raumtemperatur gebracht und pro Versuch nach dem folgenden Schema zusammengegeben.

Stammlösung	Volumen	Endkonzentration im Basismedium
1	200 ml	118,5 mM NaCl
2	8 ml	4,7 mM KCl
3	6 ml	2,5 mM CaCl ₂
4	2 ml	1,2 mM KH ₂ PO ₄
5	2 ml	1,2 mM MgSO ₄
6	34 ml	20,2 mM NaHCO ₃
7	8 ml	10,0 mM HEPES 0,2 % Albumin (2 mg/ml)

Das Medium wurde 30 Minuten mit Carbogen (95 % O₂ + 5 % CO₂) begast, um einen pH-Wert von 7,4 zu erreichen. Dies geschah zur Vermeidung von Schaumbildung vor Zugabe der Stammlösung 7. Das fertige Basismedium wurde im Wasserbad bei 37 °C temperiert und aufbewahrt.

3.1.4 Inselisolierung

3.1.4.1 Medium für die Inselisolierung

Für die Isolierung der Maus-Pankreasinseln wurde KRHA-Medium verwendet, das 5 mM Glucose enthielt. Für dessen Herstellung wurden 99 mg D-Glucose-Monohydrat in 100 ml KRHA-Medium (3.1.3) gelöst.

3.1.4.2 Durchführung der Inselisolierung

Die Isolierung der Inseln erfolgte durch Collagenase-Andau des Pankreas. Bei der angewendeten Methode handelte es sich um eine Modifikation bereits früher beschriebener Verfahren (MOSKALEWSKI, 1965; LACY und KOSTIANOVSKY, 1967; LERNMARK, 1974).

Nach Tötung der Maus durch Decapitation wurde die Bauchhöhle eröffnet, das Pankreas entnommen und in ein kleines Glas mit 3 ml glucosehaltigem KRHA-Medium (3.1.4.1) gegeben. Anschließend wurde das frische Pankreas in eine Petrischale mit 2 ml desselben Mediums (3.1.4.1) überführt und nach Entfernen evtl. vorhandenen Fremdgewebes mit einer Schere für ca. 2 Minuten in sehr kleine Stücke (< 1 mm) geschnitten. Die Suspension wurde dann in ein kleines Schraubdeckelgefäß mit 1,0 mg Collagenase (Collagenase P, Fa. Roche) pipettiert und im Schüttelwasserbad (ST1-338, Fa. Bühler) bei einer Frequenz von 328/Minute und einer Temperatur von 37 °C für 7 – 9 Minuten inkubiert. Da die verwendete Collagenase unterschiedliche Aktivität aufwies, ergab sich die genaue Dauer der Inkubation aus den Erfahrungen vorangegangener Versuche.

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde der Verdau durch kurzes Schütteln per Hand (etwa 10 Sekunden) und Auffüllen des Gefäßes mit ca. 20 ml KRHA-Glucose-Medium (3.1.4.1) unterbrochen. Nach 5 Minuten wurde der Sedimentationsüberstand etwa bis zur Hälfte entfernt, das Gefäß erneut mit dem KRHA-Glucose-Medium aufgefüllt und das angedaute Gewebe in eine Petrischale überführt. Unter dem Stereomikroskop (Stemi 2000, Fa. Zeiss) wurden nun die Inseln herauspipettiert und vom noch anhaftenden Gewebe befreit. Dabei wurden sie dreimal mit KRHA-Glucose-Medium gewaschen.

Auf diese Weise wurden für die ATP-Bestimmung 30 und für jede Perifusion 50 – 60 Inseln isoliert.

3.2 Perifusion isolierter Maus-Pankreasinseln

3.2.1 Prinzip

Für jeden Versuch wurden Pankreasinseln der Maus frisch isoliert und zuerst mit Kontrollmedium und anschließend mit Testmedium umspült. Das freigesetzte Insulin wurde mittels ELISA bestimmt. Die Perifusion erfolgte nach der am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig etablierten Methode (HASTEDT, 2003).

3.2.2 Lösungen

3.2.2.1 Kontrollmedien

A) reines KRHA-Medium (3.1.3)

B) 10 mM oder 17 mM Glucose

Die entsprechende Menge D-Glucose-Monohydrat wurde in 150 ml KRHA-Medium (3.1.3) gelöst.

C) 5 mM Aminoxyessigsäure (AOA)

81,98 mg Aminoxyessigsäure-Hemihydrochlorid wurden in 150 ml KRHA-Medium (3.1.3) gelöst. Wenn notwendig erfolgte eine pH-Adjustierung mit Alkali.

D) 2,7 μ M Glipizid

Wöchentlich wurde eine Glipizid-Stammlösung (540 μ M Glipizid, Fa. Pfizer) in 50 mM NaOH hergestellt und bei 4 °C gelagert.

Für jeden Versuch wurde diese Lösung im Verhältnis 1 : 200 verdünnt: 750 μ l dieser Stammlösung wurden zu 149,25 ml KRHA-Medium (3.1.3) gegeben.

E) 2,7 μ M Glipizid + 1 μ g/ml Glucagon

Es wurde eine Glucagon-Stammlösung (500 μ g/ml) in 1 mM NaOH hergestellt und in Aliquots eingefroren.

Für jeden Versuch wurden 301,5 μ l von 150 ml KRHA-Medium (3.1.3) entfernt und durch 301,5 μ l Glucagon-Stammlösung ersetzt. Danach wurden 750 μ l Glipizid-Stammlösung (siehe D) hinzugefügt.

F) 2,7 μ M Glipizid + 10 mM Glucose

G) 2,7 μ M Glipizid + 10 mM Tetraethylammoniumchlorid (TEA)

H) 2,7 μ M Glipizid + 5 mM Aminoxyessigsäure (AOA)

Für die Medien F bis H wurden die entsprechenden Mengen Glucose, TEA bzw. AOA eingewogen und in 150 ml KRHA-Medium (3.1.3) gelöst. 750 μ l dieser Lösung wurden entfernt und durch 750 μ l Glipizid-Stammlösung (siehe D) ersetzt.

3.2.2.2 Testmedien

Folgende Testsubstanzen wurden verwendet:

α -Ketoisocapronsäure, Natriumsalz (KIC)
 α -Ketocapronsäure, Natriumsalz (KC)
 α -Ketoisovaleriansäure, Natriumsalz (KIV)
 α -Ketovaleriansäure, Natriumsalz (KV)
n-Capronsäure, Natriumsalz (n-C)
 β -Phenylpyruvat, Natriumsalz (PP)
Natriumpyruvat (NaPyr)
Meglitinid (Fa. Aventis)
Tetraethylammoniumchlorid (TEA)
(\pm)-Methoxyverapamil-Hydrochlorid (D-600, Fa. Knoll)
D-Glucose-Monohydrat
2-Aminobicyclo[2.2.1]heptan-2-carbonsäure (BCH)
Monomethylsuccinat (MMS)

Die Konzentrationen der verwendeten Testmedien sind im Ergebnisteil angegeben. Zu deren Herstellung wurde die entsprechende Menge der Testsubstanz in 50 ml des jeweils im Ergebnisteil angegebenen Kontrollmediums (3.2.2.1) gelöst. Wenn notwendig, z. B. bei MMS, erfolgte eine pH-Adjustierung mit Alkali.

Eine Ausnahme bildeten Meglitinid und D-600. Von Meglitinid wurde zunächst eine 10 mM Stammlösung in 20 mM NaOH hergestellt und in Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Daraus wurde täglich eine zweite Stammlösung (0,25 mM; 1,25 mM; 7,5 mM) durch Verdünnung mit Aqua bidest. hergestellt. Pro Versuch wurden 100,2 μl dieser Stammlösung zu 50 ml des entsprechenden Kontrollmediums gegeben.

Von D-600 wurde täglich eine frische wässrige Stammlösung (5 mM) hergestellt. 505 μl dieser Stammlösung wurden zu 50 ml des entsprechenden Kontrollmediums gegeben.

Unter den Versuchsbedingungen (pH 7,4 und max. 20 mM-Konzentrationen der Testsubstanzen) liegen die verwendeten α -Ketomonocarbonsäuren überwiegend als Anionen vor.

Es werden allerdings weiterhin die Bezeichnungen „ α -Ketomonocarbonsäuren“, „ α -Keto(iso)capronsäure“, „ α -Keto(iso)valeriansäure“ und „n-Capronsäure“ statt „ α -Ketomonocarbonsäure-Anionen“, „ α -Keto(iso)capronat“, „ α -Keto(iso)valerat“ und „n-Capronat“ verwendet.

3.2.3 Durchführung

3.2.3.1 Perifusion

Für die Perifusion der isolierten Maus-Pankreasinseln wurde das bereits 1977 von PANTEN et al. beschriebene Mikroperifusionssystem eingesetzt (Abb. 3.1).

Etwa 2 Stunden vor Beginn eines Versuches wurde die Apparatur auf 37 °C vorgewärmt und während der gesamten Versuchsdauer konstant bei dieser Temperatur gehalten.

Zur Vorbereitung der Perifusionskammer wurden zuerst ein Filter (SMWP01300, Fa. Millipore) und dann ein Silikon-Dichtungsring (SX0001301, Fa. Millipore) mit Hilfe einer Deckglaspinzette in die Rille am Kammerkonus eingelegt. Danach wurde der Ableiteteil aufgeschraubt. Dabei war auf die Unversehrtheit des Filters und den richtigen Sitz des Dichtungsringes zu achten.

Anschließend erfolgte die Inselisolierung wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben.

Etwa 30 Minuten vor Versuchsstart wurden 100 ml des jeweiligen Kontrollmediums (3.2.2.1) in Messzylinder A und 50 ml des jeweiligen Testmediums (3.2.2.2) in Messzylinder B gefüllt, in die Perifusionsapparatur gestellt und über eingeführte Begasungsschläuche mit Carbogen begast. Die Begasung des Systems mit Carbogen wurde bis zum Ende des Versuches fortgesetzt. Kurz vor Versuchsstart wurde der Begasungsschlauch aus Messzylinder A, kurz vor dem Wechsel auf das Testmedium der Begasungsschlauch aus Messzylinder B entfernt, und jeweils durch einen Ansaugschlauch ersetzt. Durch kurzzeitiges Starten der Peristaltikpumpen (12000 Varioperpex, Fa. LKB, Schweden) wurde das Schlauchsystem luftblasenfrei mit dem Kontroll- bzw. Testmedium gefüllt. Die Fließgeschwindigkeit (0,9 ml/Minute) wurde vor jedem Versuch kontrolliert.

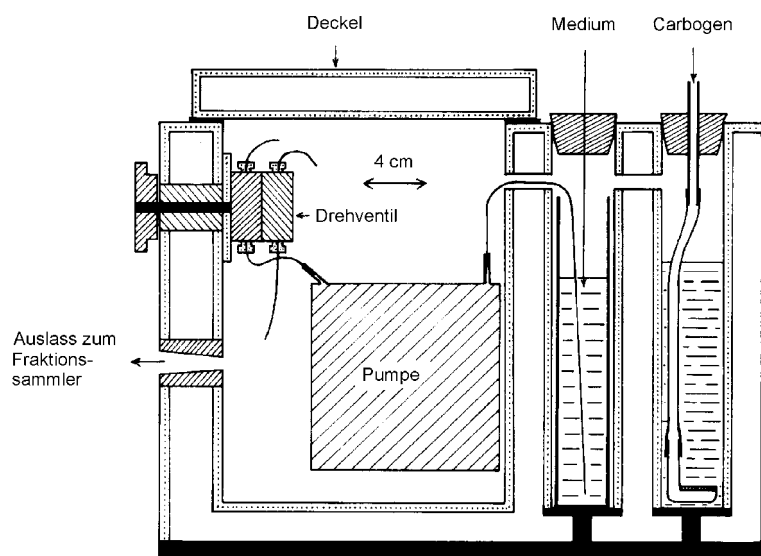


Abb. 3.1 *Seitenansicht des Modells des Mikroperifusionssystems nach PANTEN et al. (1977).*

Sobald die Inseln isoliert waren, wurde die Kammer luftblasenfrei mit KRHA-Glucose-Medium (3.1.4.1) gefüllt. Dies erfolgte mit Hilfe einer 5 ml-Spritze, die über einen Kunststoffkonus mit dem Ableiteschlauch der Kammer verbunden war. Die isolierten Inseln wurden mit einer Pipette ebenfalls luftblasenfrei in die Kammer überführt. Nach Einlegen eines weiteren Dichtungsringes wurde die Perifusionskammer durch Aufschrauben des Zuflussschlauchfittings mit dem Schlauchsystem verbunden und mit Klebeband an der Innenseite der Perifusionsapparatur befestigt. Der Ableiteschlauch wurde aus der Perifusionsapparatur hinausgeführt und mit einem Fraktionssammler (Cygnet, Fa. Isco, USA) verbunden.

Durch Einschalten der ersten Pumpe wurde der Versuch gestartet, sodass die Inseln in der Kammer mit dem Kontrollmedium umströmt wurden. Das Perifusat der ersten 40 Minuten wurde verworfen. Das Perifusat der folgenden 20 Minuten wurde in 5 Fraktionen à 4 Minuten gesammelt. Nach 60-minütiger Perifusion mit dem Kontrollmedium, d. h. beim Wechsel auf die 6. Fraktion, wurde das Perifusionsmedium durch Drehen des Ventils gewechselt, sodass die Inseln mit dem Testmedium umströmt wurden. Zu Beginn dieser Testphase wurden 8 Fraktionen à 1 Minute genommen und anschließend weitere 9 Fraktionen à 4 Minuten. Von den insgesamt 22 Fraktionen wurde jeweils 1 ml in Eppendorf-Reagiergefäßen bis zur Auswertung mittels ELISA bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Vor und nach dem Versuch wurde der pH-Wert des Kontroll- und Testmediums kontrolliert (pH-Meter 765 Calimatic, Fa. Knick).

Nach Beendigung des Versuches wurde die Perifusionskammer vom Schlauchsystem getrennt, geöffnet und nach Entfernen des Filters mit den perifundierten Inseln mit Aqua bidest. gereinigt. Die Einzelteile wurden anschließend bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Das Schlauchsystem wurde 10 Minuten mit Aqua bidest., 20 Minuten mit Ethanol 70 % und nochmals 15 Minuten mit Aqua bidest. gespült und anschließend durch 15-minütiges Ansaugen von Luft getrocknet. Während des Spülvorganges wurde das Drehventil mehrfach betätigt.

3.2.3.2 Bestimmung des Insulingehaltes

Zur Bestimmung des freigesetzten Insulins wurde ein enzymatischer Immunoassay (ELISA) eingesetzt (Rat Insulin ELISA, Nr. 10-1124-01, Fa. Mercodia, Schweden). Grundlage dieses Assays war das sogenannte Sandwich-Prinzip. Die Mikrotiterplatte war mit einem monoklonalen Antikörper gegen Insulin beschichtet, an den das Insulin aus der Probe band. Ein zweiter, mit Peroxidase konjugierter, monoklonaler Antikörper, der gegen eine andere antigenetische Determinante des Insulinmoleküls gerichtet war, wurde hinzugefügt und reagierte ebenfalls mit dem Insulin aus der Probe („Sandwich“). Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden (Schüttelinkubator SLT IS 2.10, Fa. SLT) wurden ungebundene Anteile des markierten Antikörpers durch Waschen entfernt. Durch Zugabe des Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin kam es mittels Peroxidase zur Bildung einer farbigen Verbindung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure abgebrochen und die Absorption des entstandenen Farbstoffes UV-spektroskopisch bei $\lambda = 450\text{ nm}$ ermittelt (Photometer SLT 340 ATTC, Fa. SLT). Die Absorption des gebildeten Farbstoffes war proportional zur Konzentration des gebundenen

markierten Antikörpers und somit auch zur Konzentration des enthaltenen Insulins.

Der Insulingehalt der Proben wurde mit Hilfe des Computerprogramms „Easy-Fit“ (Version 5.74, Fa. SLT) anhand einer Standardkurve bestimmt. Für deren Erstellung wurden bei jedem Testansatz Insulinstandards parallel mit den Proben inkubiert. Die Konzentrationen der Standards lagen zwischen 0 und 5,5 µg/l. Wiesen die Proben einen Insulingehalt von über 5,5 µg/l auf, so wurden sie mit Nullstandard verdünnt. Keine der eingesetzten Testsubstanzen (α -Ketomonocarbonsäuren, Meglitinid, TEA, D-600, Glucose, BCH und MMS) beeinflusste die Insulinbestimmung.

3.2.4 Darstellung der Ergebnisse

Die mit Hilfe der Standardkurve erhaltenen Insulinkonzentrationen (angegeben in µg/l), die sich auf den Gesamtgehalt in der Probe bezogen, wurden umgerechnet auf die pro Minute abgegebene Insulinmenge einer Insel (angegeben in $\text{pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$). Diese Werte wurden der Mitte des Zeitintervalls einer Fraktion zugeordnet.

Für die Betrachtungen der relativen Sekretionsrate wurde die pro Insel freigesetzte Insulinmenge in der 5. Fraktion (Minute 58, unmittelbar vor Wechsel auf das Testmedium) auf 100 % gesetzt und die anderen ermittelten Werte auf diesen bezogen.

Die Ergebnisse sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte der absoluten Sekretionsrate (in pg Insulin pro Minute pro Insel) bzw. der relativen Sekretionsrate (in Prozent) plus oder minus SEM von n Einzelversuchen. Die Fehlerbalken sind nur erkennbar, wenn sie größer als die Symbole in der Abbildung sind.

3.3 Bestimmung der Aktivität der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase

3.3.1 Prinzip

Die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität wurde mit einer Modifikation des von BROWN et al. (2000) angegebenen Verfahrens bestimmt. Dieses Enzym katalysiert die oxidative Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA und CO_2 bei Anwesenheit von Coenzym A und NAD. Das dabei entstehende NADH weist ein Absorptionsmaximum bei 340 nm auf, sodass seine Bildung photometrisch bestimmt werden kann. Die Kinetik der NADH-Bildung ermöglicht die Bestimmung der Aktivität der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase.

3.3.2 Lösungen

3.3.2.1 Grundmedien

A) 100 mM Tris + 2 mM MgCl_2 ; pH 7,4

B) 100 mM Tris + 2 mM MgCl_2 + 2 mM EGTA; pH 7,4

C) 100 mM Tris + 2 mM $MgCl_2$ + 1 mM $CaCl_2$; pH 7,4

D) 100 mM Tris + 2 mM $MgCl_2$ + 2 mM EGTA + 2,2 mM $CaCl_2$; pH 7,4

Die jeweiligen Substanzen wurden in Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert der Lösung mit HCl auf 7,4 eingestellt. Die Medien wurden bei 4 °C gelagert.

3.3.2.2 Stammlösungen

A) α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH; ~ 600 mU/ml oder ~ 1800 mU/ml)

Die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Lösung (aus dem Schweineherz, $\sim 11,7$ mg Protein/ml $\approx 0,54$ U/mg Protein) wurde im Verhältnis 1 : 10 oder 3 : 10 mit dem jeweils für den Versuch verwendeten Grundmedium (3.3.2.1 A bis D) verdünnt.

B) Coenzym A (CoA-SH; 20 mM)

Das Coenzym A wurde in Phosphat-Puffer (pH 7) gelöst und in Aliquots in Eppendorf-Reagiergefäße abgefüllt. Diese Gefäße wurden unter Stickstoffatmosphäre in einem Schraubdeckelglas bei -20 °C gelagert.

C) NAD (80 mM)

Es wurde β -NAD (Fa. Roche) eingesetzt.

D) Thiaminpyrophosphat (TPP, syn. Cocarboxylase; 8 mM)

Thiaminpyrophosphat diente als Coenzym der Reaktion

E) Dithiothreitol (DTT; 4 mM)

Dithiothreitol diente dem selektiven Schutz der SH-Gruppen des Coenzym A und der Dehydrogenase.

F) α -Ketoglutarat (14 mM)

Die wässrigen Stammlösungen C bis F wurden in Aliquots bei -20 °C eingefroren.

3.3.2.3 Testlösungen

Es wurden wässrige Stammlösungen (15 mM oder 50 mM) der folgenden Testsubstanzen hergestellt und bei -20 °C gelagert.

α -Ketoisocapronsäure, Natriumsalz (KIC)

α -Ketocapronsäure, Natriumsalz (KC)

α -Ketoisovaleriansäure, Natriumsalz (KIV)

α -Ketovaleriansäure, Natriumsalz (KV)

β -Phenylpyruvat, Natriumsalz (PP)

n-Capronsäure, Natriumsalz (n-C)

3.3.2.4 Kontrolllösung

Als Kontrolllösung diente eine wässrige Natriumchlorid-Lösung in derselben Konzentration wie die Testlösungen.

3.3.3 Durchführung der Enzymbestimmung

Zunächst wurden pro Einzelbestimmung 100 μl des im Ergebnisteil angegebenen Grundmediums (3.3.2.1 A bis D) mit jeweils 5 μl der Stammlösungen A bis E (3.3.2.2) versetzt. Dieses Reagenzgemisch wurde pro Tag für alle Versuche einer Versuchsreihe gemeinsam angesetzt. 125 μl dieses enzymhaltigen Reagenzgemisches und 40 μl der gewünschten Testlösung (3.3.2.3) wurden in ein Well einer transparenten Mikrotiterplatte aus Polystyrol (Nr. 82.1581, Fa. Sarstedt) pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 oder 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates (35 μl α -Ketoglutarat-Stammlösung, 3.3.2.2 F) gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde durch Messung der Absorption bei 340 nm mit Hilfe eines Photometers (Wallac 1420 Multilabel counter, Fa. Perkin-Elmer) im Abstand von 15 – 20 sec registriert.

Für die Bestimmung der unbeeinflussten Enzymaktivität wurde als Kontrolllösung NaCl (3.3.2.4) anstatt der Testlösungen verwendet.

Zur Bestimmung des Blindwertes wurden jeweils Parallelversuche mit enzymfreiem Reagenzgemisch durchgeführt. Dieses wurde analog zum enzymhaltigen Reagenzgemisch aus 105 μl des entsprechenden Grundmediums und je 5 μl der Stammlösungen B bis E (3.3.2.2) hergestellt. Alle Versuche wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.3.4 Darstellung der Ergebnisse

Für die Auswertung wurden die Mittelwerte der Doppelbestimmungen verwendet. Einflüsse des Mediums auf die Absorption wurden durch Differenzbildung zwischen Proben- und Blindwert berücksichtigt.

Für den Vergleich des Einflusses der einzelnen Substanzen auf die Aktivität der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase wurde der Anstieg der Absorption innerhalb der ersten 15 Minuten nach Zugabe des Substrates herangezogen (Differenz der Absorption nach 15 Minuten und der Absorption bei Start der Reaktion). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM von n Einzelversuchen.

3.4 Bestimmung des ATP- und ADP-Gehaltes in Maus-Pankreasinseln

3.4.1 Prinzip

Die Bestimmung des ATP- und ADP-Gehaltes in isolierten Maus-Pankreasinseln erfolgte mit einer Modifikation des von DETIMARY et al. (1996) beschriebenen Verfahrens.

Es wurde der ATP-Biolumineszenz-Kit (FL-AA) der Firma Sigma eingesetzt. Dabei entstanden aus ATP und Luciferin unter Katalyse durch Luciferase bei Anwesenheit von Magnesium-Ionen Pyrophosphat und Adenyl-Luciferin. Dieses reagierte mit Sauerstoff unter Lichtemission zu Oxyluciferin, AMP und CO₂. Die freigesetzte Lumineszenz war proportional zum ATP-Gehalt in den Proben. Der ADP-Gehalt wurde indirekt bestimmt nach Umwandlung des ADP zu ATP durch die Pyruvatkinase-Reaktion. Die Pyruvatkinase katalysiert die Bildung von ATP und Pyruvat aus ADP und Phosphoenolpyruvat.

3.4.2 Lösungen

3.4.2.1 Grundmedien

A) reines KRHA-Medium (3.1.3)

B) 5,4 µM Glipizid

Wöchentlich wurde eine Glipizid-Stammlösung (540 µM) in 50 mM NaOH hergestellt. Aus dieser wurde das Grundmedium täglich frisch durch Verdünnung im Verhältnis 1 : 100 mit KRHA-Medium hergestellt.

3.4.2.2 Kontrollmedien

A) reines KRHA-Medium

B) 2,7 µM Glipizid

Das Kontrollmedium wurde durch Verdünnung des Glipizid-Grundmediums (3.4.2.1 B) mit KRHA-Medium im Verhältnis 1 : 2 hergestellt.

3.4.2.3 Testmedien

A) 33,3 mM Glucose

16,50 mg D-Glucose-Monohydrat wurden in 2,5 ml KRHA-Medium (3.1.3) gelöst.

B) 11,1 mM KIC

4,22 mg KIC wurden in 2,5 ml KRHA-Medium gelöst.

D) 2,7 µM Glipizid + 33,3 mM Glucose

16,50 mg D-Glucose-Monohydrat wurden in 2,5 ml Glipizid-Kontrollmedium (3.4.2.2 B) gelöst.

E) 2,7 μ M Glipizid + 11,1 mM KIC

4,22 mg KIC wurden in 2,5 ml Glipizid-Kontrollmedium gelöst.

*3.4.2.4 Standardlösungen**A) ATP-Standards*

Es wurde zunächst eine 1 mM ATP-Stammlösung hergestellt. Dazu wurden 6,05 mg ATP, Dinatriumsalz (Fa. Roche), in 10 ml Aqua bidest. gelöst, der pH-Wert mit 0,02 N-KOH auf 7 bis 7,5 eingestellt und die Lösung in Aliquots eingefroren.

Diese Stammlösung wurde in zwei Schritten auf eine Konzentration von 300 pmol/100 μ l mit KRHA-Medium (3.1.3) verdünnt.

Durch weitere Verdünnung mit KRHA-Medium wurden Standards mit 30; 60; 90 und 120 pmol/100 μ l, entsprechend 5; 10; 15 und 20 pmol/Well der Mikrotiterplatte (Lumitrac 200, Nr. 655 075, Fa. Greiner), hergestellt.

B) ADP-Standard

Die Herstellung der ADP-Stammlösungen erfolgte analog zur Herstellung der ATP-Stammlösungen (siehe A). Es wurde das Monokaliumsalz von ADP (Fa. ICN Biomedicals) eingesetzt.

Als Standard wurde eine Konzentration von 60 pmol/100 μ l, entsprechend 10 pmol/Well der Mikrotiterplatte (Lumitrac 200, Nr. 655 075, Fa. Greiner), verwendet.

*3.4.2.5 Reagenzien**A) Trichloressigsäure (TCA; 15 %)*

Die wässrige Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

B) Neutralisierpuffer (20 mM HEPES + 3 mM $MgCl_2$; pH 7,75)

Die Einstellung der wässrigen Lösung auf pH 7,75 erfolgte mit 1 N-KOH. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

C) Phosphoenolpyruvat (PEP; 40 mM)

Die wässrige Lösung von Phosphoenolpyruvat (Fa. Boehringer) wurde in Aliquots bei – 70 °C eingefroren.

D) Reaktionsgemisch 1 (20 mM HEPES + 3 mM $MgCl_2$ + 1,6 mM PEP; pH 7,75)

Zu 2 ml Neutralisierpuffer (siehe B) wurden 80 μ l PEP-Lösung (siehe C) gegeben.

E) Reaktionsgemisch 2 (20 mM HEPES + 3 mM $MgCl_2$ + 1,6 mM PEP + 2,5 U/ml PK; pH 7,75)

Zu 1 ml Reaktionsgemisch 1 (siehe D) wurden 1,25 μ l Pyruvatkinase-Suspension (PK; 2000 U/ml, Fa. Roche) gegeben.

Beide Reaktionsgemische wurden täglich frisch hergestellt und sofort verwendet.

3.4.3 Durchführung

3.4.3.1 Inkubation und Extraktion

Es wurden Parallelinkubationen von Probe und Kontrolle durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Inkubation wurden zwei Schraubdeckelgefäße mit 1,8 ml Aqua bidest. gefüllt, für 5 Minuten mit Carbogen begast und im Wasserbad bei 37 °C temperiert. Anschließend wurden wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben 30 Maus-Pankreasinseln isoliert, vom umliegenden Gewebe befreit und in substratfreiem KRHA-Medium (3.1.3) aufgenommen. Je 15 Inseln wurden mit 100 µl KRHA-Medium in 1,5 ml Eppendorf-Reagiergefäße überführt. Dann wurde in beide Reagiergefäße je nach Versuchsserie entweder 100 µl Grundmedium 3.4.2.1 A (KRHA-Medium) oder 100 µl Grundmedium 3.4.2.1 B (5,4 µM Glipizid) gegeben. Die beiden Reagiergefäße wurden mit geöffnetem Deckel in die vorbereiteten Schraubdeckelgefäße gestellt und für 1 Minute mit Carbogen überblasen. Darauf folgte eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad (Schüttelstellung 7, Fa. Köttermann).

Nach dieser Vorinkubation wurden jeweils 180 µl Grundmedium entfernt und durch 180 µl Kontrollmedium (3.4.2.2) bzw. Testmedium (3.4.2.3) ersetzt. Nach dem Medienwechsel wurden die Proben erneut für 1 Minute mit Carbogen überblasen und für 40 Minuten zurück in das Schüttelwasserbad gestellt.

Nach der Hauptinkubation erfolgte eine Enzym-Denaturierung und Nukleotid-Extraktion durch Zugabe von 100 µl eiskalter Trichloressigsäure (TCA, 3.4.2.5 A). Die Proben wurden kurz gevortext, für 5 Minuten in Eiswasser gestellt und die gefällten Proteine durch Zentrifugieren abgetrennt (5 Minuten bei 3000 g, Biofuge A, Fa. Heraeus). 240 µl des Überstandes wurden abgenommen und zur Extraktion der TCA dreimal mit je 900 µl Diethylether, mit Wasser gesättigt, ausgeschüttelt. Die Proben wurden mit 240 µl Neutralisierpuffer (3.4.2.5 B) neutralisiert und bei – 70 °C eingefroren.

Zur Erstellung der Standardgeraden wurden die ATP-Standards (5 – 20 pmol/Well) und zur Kontrolle der enzymatischen Umsetzung der ADP-Standard (10 pmol/Well) ab Zugabe der TCA parallel zu den Proben bearbeitet.

3.4.3.2 ATP- und ADP-Bestimmung

Das lyophilisierte Pulver des Assay Mixes aus dem ATP-Biolumineszenz-Kit wurde in 5 ml Aqua bidest. gelöst und in Aliquots bei – 20 °C eingefroren. Für die Versuche wurde der Assay Mix im Verhältnis 1 : 35 mit Assay Mix Dilution Buffer verdünnt. Die Verdünnung diente der Einstellung des Assays auf den gewünschten ATP-Bestimmungsbereich (ca. 4 nmol/l bis 4 µmol/l).

Für die Bestimmung der Summe von ATP und ADP wurden 100 µl Reaktionsgemisch 2 (mit PK, 3.4.2.5 E) zu 200 µl der Proben bzw. Standards gegeben.

Um die Bestimmung der ATP-Konzentration unter ähnlichen Bedingungen ablaufen zu lassen, wurden zu weiteren 200 µl der Proben bzw. Standards je 100 µl des Reaktionsgemi-

sches 1 (ohne PK, 3.4.2.5 D) gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden jeweils 100 µl der Proben bzw. Standards in Doppelbestimmung in Wells einer Mikrotiterplatte (Lumitrac 200, Nr. 655 075, Fa. Greiner) pipettiert und der Gehalt an ATP luminometrisch im Photometer (Wallac 1420 Multilabel counter, Fa. PerkinElmer) bestimmt. Die Messung erfolgte pro Well und begann mit der Zugabe von 100 µl Assay Mix mittels eines Dispensers. Nach kurzzeitigem Schütteln und einer Sekunde Wartezeit wurde die Lumineszenz über 10 s gemessen.

Die gemessene Lumineszenz wurde in counts per second angegeben.

3.4.4 Darstellung der Ergebnisse

Für die Auswertung wurden die Mittelwerte der Doppelbestimmungen verwendet. Sowohl zur Ermittlung des ATP-Gehaltes als auch der Summe von ATP- und ADP-Gehalt der Proben wurde jeweils eine Standardgerade durch lineare Regression erstellt. Der ADP-Gehalt ergab sich aus der Differenz des ATP- plus ADP-Gehaltes (aus den Proben mit PK-Zusatz) und des reinen ATP-Gehaltes (aus den Proben ohne PK-Zusatz). Die anhand der Standardgeraden ermittelten Werte in pmol Nukleotid pro Well wurden umgerechnet auf pmol Nukleotid pro Insel.

Im Ergebnisteil sind die Mittelwerte \pm SEM von n Einzelversuchen angegeben.

3.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit nichtparametrischen Tests durchgeführt (HOLLANDER und WOLFE, 1993). Zunächst wurde mit dem Kruskal-Wallis Test geprüft, ob die Stichproben der gleichen Grundgesamtheit entstammten. Anschließend wurden Unterschiede zwischen interessierenden Gruppen mit dem zweiseitigen U-Test von Wilcoxon und von Mann und Whitney analysiert, wobei im Fall multipler Vergleiche mit dem Bonferroni-Holm Verfahren korrigiert wurde. Zwei verbundene Stichproben wurden mit dem Wilcoxon Test für Paardifferenzen analysiert. Bei $p < 0,05$ wurde Signifikanz angenommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Einfluss von Monocarbonsäuren auf die Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln

4.1.1 K_{ATP} -Kanal-unabhängige Stimulation der Insulinsekretion durch Monocarbonsäuren bei Abwesenheit eines anderen Substrates

Um die K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Effekte der Monocarbonsäuren auf die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle zu untersuchen, wurden Perifusionsversuche durchgeführt, bei denen isolierte Maus-Pankreasinseln mit KRHA-Medium ohne Zusatz eines Substrates, aber bei Anwesenheit einer maximal wirksamen Konzentration des Sulfonylharnstoffs Glipizid umströmt wurden (Abb. 4.1). In dieser Konzentration ($2,7 \mu\text{M}$, entsprechend einer freien Konzentration von $1,6 \mu\text{M}$; PANTEN et al., 1989) werden alle K_{ATP} -Kanäle der β -Zelle blockiert (ZÜNKLER et al., 1988), sodass die Insulinsekretion nur durch K_{ATP} -Kanal-unabhängige Effekte weiter gesteigert werden kann.

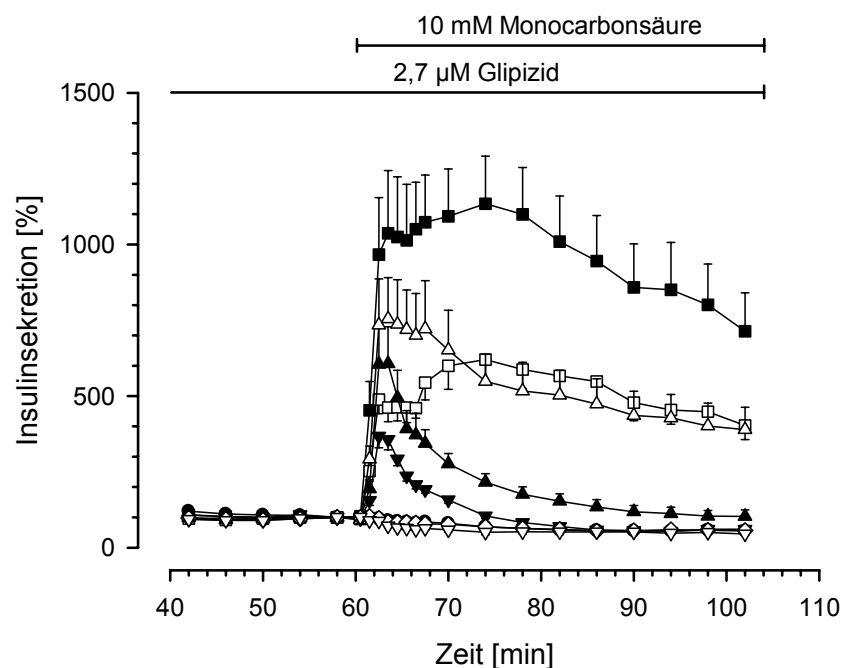


Abb. 4.1 K_{ATP} -Kanal-unabhängige Stimulation der Insulinsekretion durch Monocarbonsäuren bei Abwesenheit eines anderen Nährstoffes. Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1 – 104) mit Basismedium umströmt, das $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid enthielt. Nach 60 Minuten wurden entweder KIC (■), KC (□), KIV (▲), KV (△), PP (▼), n-C (◇) oder NaPyr (▽) (jeweils in einer Konzentration von 10 mM) hinzugefügt. Es wurden auch Kontrollversuche ohne Zugabe einer Monocarbonsäure (●) durchgeführt.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 5 – 11 Einzelversuchen + oder – SEM der relativen Insulinsekretionsrate (Prozent) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten. Als Bezugswert diente die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor Zugabe der Testmedien (Minute 58 = 100 %). 4 der 8 Versuche mit 10 mM PP wurden bereits von Frau Hastedt hier am Institut durchgeführt (HASTEDT, 2003).

Nach 60 Minuten Umströmung der Maus-Pankreasinseln mit 2,7 μ M Glipizid im Basismedium und bei Abwesenheit eines Substrates, betrug die mittlere Insulinsekretionsrate aus 63 Versuchen (alle Versuche der Abb. 4.1) $13,6 \pm 1,0$ pg Insulin pro Minute pro Insel und war damit deutlich höher als bei Abwesenheit von Glipizid (vgl. 4.1.3). Durch Zugabe von 10 mM KIC wurde die Insulinsekretion innerhalb von 4 Minuten auf 1000 % gesteigert, blieb für etwa 20 Minuten auf diesem Niveau und fiel zum Versuchsende auf 700 % ab. 10 mM KC dagegen steigerte die Insulinsekretion zunächst nur auf 500 %. Nach 14 Minuten erreichte die Steigerung ihr Maximum bei 620 % und fiel bis zum Ende des Versuches wieder auf 400 % ab. Nach Zugabe von 10 mM KV stieg die Sekretionsrate zunächst auf 750 %, ging dann aber innerhalb von 10 Minuten auf das Niveau von KC zurück und zeigte über die gesamte weitere Versuchsdauer ein nahezu identisches Sekretionsprofil wie KC. Sowohl 10 mM KIV als auch 10 mM PP steigerten die Insulinsekretion nur kurzzeitig auf 600 % (KIV) bzw. 360 % (PP). Die Sekretionsrate bei Anwesenheit von 10 mM KIV lag ab Minute 82 nur leicht über den Werten der Kontrollwerte ohne Monocarbonsäure. Am Ende des Versuches erreichte die Sekretionsrate wieder das Ausgangsniveau, war aber noch signifikant größer als die der Kontrollversuche ($p < 0,05$). Nach Zugabe von PP unterschied sich der Sekretionsverlauf ab Minute 74 nicht mehr von dem der Kontrollversuche ohne Monocarbonsäure. 10 mM NaPyr und 10 mM n-C führten zu keiner Sekretionssteigerung im Vergleich zur Kontrolle. Die Gesamtsekretionsrate, berechnet aus der Fläche unter der Kurve während der Testperiode, war bei KIC signifikant höher als bei KC ($p < 0,01$). KC und KV unterschieden sich nicht in ihrer Gesamtsekretionsrate ($p > 0,05$). KIV war deutlich schwächer wirksam als KV ($p < 0,02$), aber signifikant stärker als PP ($p < 0,05$).

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Effekte der α -Ketomonocarbonsäuren auf die Insulinsekretion der Maus-Pankreasinseln zu untersuchen, wurden Versuche durchgeführt, bei denen Konzentrationen von 1 mM (Abb. 4.2 A) bzw. 20 mM (Abb. 4.2 B) eingesetzt wurden. Die Sekretionsprofile von KIC und KC wiesen eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit auf. Die Sekretionsrate stieg nach Zugabe von 1 mM KIC auf 500 %, fiel aber schnell wieder ab und erreichte am Ende der Testperiode das Kontrollniveau. Bei 20 mM-Konzentrationen war der Effekt von KIC und KC nahezu identisch. Das Maximum der Sekretionsrate nach Zugabe von 20 mM KIC bzw. KC lag bei 830 % bzw. 900 % und fiel innerhalb der Testperiode kontinuierlich auf 180 % nach 44 Minuten ab. Das Sekretionsprofil nach Zugabe von 1 mM PP unterschied sich von dem nach Zugabe von 10 mM PP nur in der maximalen Sekretionsrate von 270 % (1 mM PP) bzw. 360 % (10 mM PP, vgl. Abb. 4.1). Eine Konzentration von 1 mM KIV reichte nicht aus, um eine Steigerung der Insulinsekretion auszulösen. Natriumpyruvat konnte auch in einer Konzentration von 20 mM die Insulinsekretion nicht steigern.

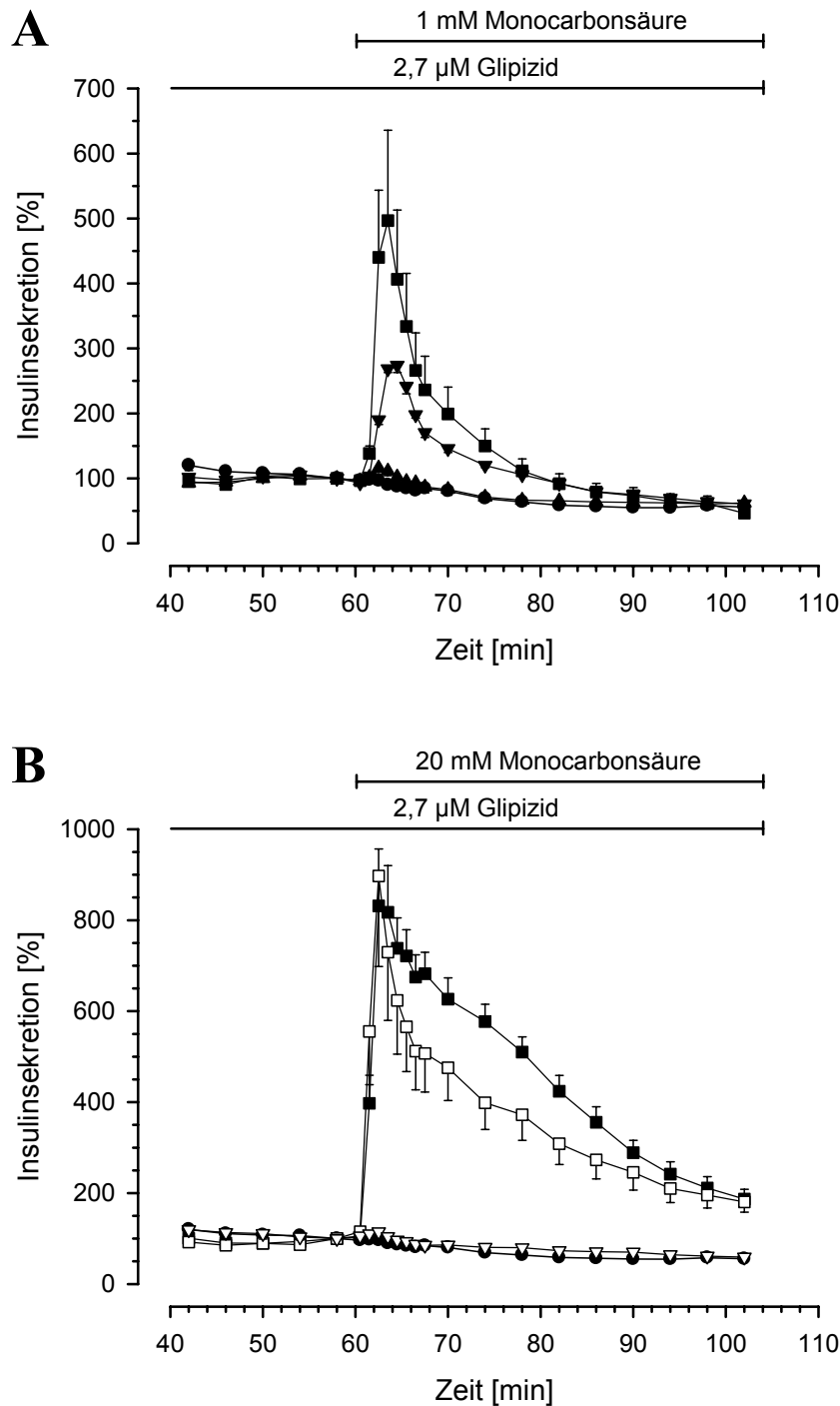


Abb. 4.2 Konzentrationsabhängigkeit der K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Stimulation der Insulinsekretion durch Monocarbonsäuren bei Abwesenheit eines anderen Nährstoffes.

Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1 – 104) mit Basismedium umströmt, das 2,7 µM Glipizid enthielt.

A Nach 60 Minuten wurden entweder KIC (■), KIV (▲) oder PP (▼) (jeweils in einer Konzentration von 1 mM) hinzugefügt.

B Nach 60 Minuten wurden entweder KIC (■), KC (□) oder NaPyr (▽) (jeweils in einer Konzentration von 20 mM) hinzugefügt.

Es wurden auch Kontrollversuche ohne Zugabe einer Monocarbonsäure (●) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 5 – 8 Einzelversuchen + oder – SEM der relativen Insulinsekretionsrate (Prozent) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten. Als Bezugswert diente die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor Zugabe der Testmedien (Minute 58 = 100 %). 4 der 8 Versuche mit 20 mM KIC wurden bereits von Frau Hastedt hier am Institut durchgeführt (HASTEDT, 2003).

4.1.2 K_{ATP} -Kanal-unabhängige Stimulation der Insulinsekretion durch Monocarbonsäuren bei Anwesenheit von 10 mM Glucose

Bei Anwesenheit von 10 mM Glucose war der Effekt auf die K_{ATP} -Kanal-unabhängige Insulinsekretion bei allen getesteten Substanzen wesentlich langsamer und geringer als bei Abwesenheit von Glucose (Abb. 4.1). Die absolute Insulinsekretionsrate nach 60-minütiger Perfusion mit 10 mM Glucose und 2,7 μ M Glipizid im Basismedium lag mit $77,0 \pm 4,0$ pg Insulin pro Minute pro Insel ($n = 38$, alle Versuche der Abb. 4.3) allerdings wesentlich höher, da nun die Insulinsekretion nicht nur durch eine maximale Konzentration des Sulfonylharnstoffs, sondern zusätzlich durch eine stimulatorische Konzentration von Glucose gesteigert wurde.

Die Sekretionssteigerung als Antwort auf 10 mM KIC verlief langsamer und erreichte ihr Maximum (510 %) erst nach ca. 10 Minuten. Die Reaktion auf 10 mM KC (max. 430 %) war geringer als die auf KIC, aber über die gesamte Zeit höher als die auf 10 mM KV (max. 320 %). In allen drei Fällen kam es während der Perfusion zu einem Rückgang der Sekretion auf 320 % (KIC), 260 % (KC) oder 200 % (KV) nach 44 Minuten. 10 mM KIV führte nur zu einem geringen Anstieg (160 %), der aber über die gesamte Perifusionsdauer anhielt. 10 mM PP und 10 mM n-C steigerten die Insulinsekretion zunächst auf 260 % (PP) bzw. 200 % (n-C) und fielen ab Minute 70 in identischem Ausmaß kontinuierlich bis zum Kontrollniveau ab.

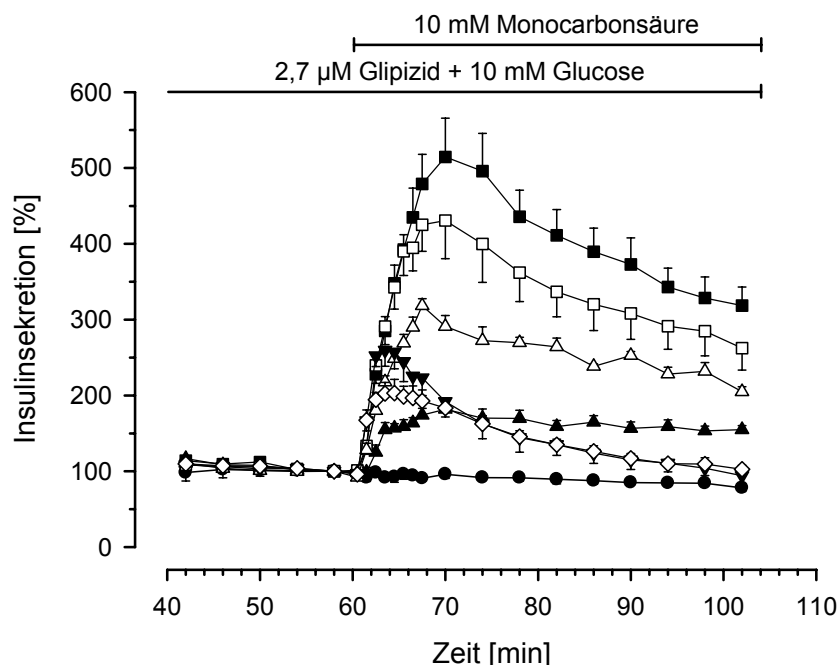


Abb. 4.3 K_{ATP} -Kanal-unabhängige Stimulation der Insulinsekretion durch Monocarbonsäuren bei Anwesenheit von 10 mM Glucose. Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1 – 104) mit Basismedium umströmt, das 2,7 μ M Glipizid und 10 mM Glucose enthielt. Nach 60 Minuten wurden entweder KIC (■), KC (□), KIV (▲), KV (△), PP (▼) oder n-C (◇) (jeweils in einer Konzentration von 10 mM) hinzugefügt. Bereits von Frau Hastedt wurden hier am Institut auch Kontrollversuche ohne Zugabe

einer Monocarbonsäure (●) durchgeführt (HASTEDT, 2003). Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 4 – 6 Einzelversuchen + oder – SEM der relativen Insulinsekretionsrate (Prozent) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten. Als Bezugswert diente die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor Zugabe der Testmedien (Minute 58 = 100 %).

Unterschiede zu den Versuchen mit Glipizid, aber ohne Glucose waren die dauerhaft stärkere Wirkung von KC im Vergleich zu KV, der Wegfall des starken initialen Anstiegs bei KIV und die Reaktion auf n-C, die bei Abwesenheit von Glucose (Abb. 4.1) nicht vorhanden war. Die Reihenfolge der Stärke der Sekretionssteigerung auf Basis der mittleren relativen Sekretionsrate pro Minute pro Insel (in Klammern angegeben) berechnet aus der Fläche unter der Kurve war: KIC (383 %) > KC (325 %) > KV (244 %) > KIV (159 %) \approx PP (147 %) \approx n-C (141 %) > Kontrolle (89 %).

4.1.3 Stimulation der Insulinsekretion bei Abwesenheit von Glucose und Glipizid

Um zu klären, welchen Anteil der K_{ATP} -Kanal-unabhängige Weg am Gesamtwert der sekretionssteigernden Wirkung der Monocarbonsäuren hat, wurden Perfusionen mit reinem KRHA-Medium, ohne Zusatz eines anderen Substrates oder Stimulators durchgeführt. Die Insulinsekretion dieser Maus-Pankreasinseln mit nicht blockierten K_{ATP} -Kanälen lag 60 Minuten nach der Perfusion mit reinem KRHA-Medium bei $4,7 \pm 0,1$ pg Insulin pro Minute pro Insel ($n = 64$, alle Versuche aus Abb. 4.4).

Nach Zugabe von 10 mM KIC stieg die Sekretionsrate sehr rasch auf 2600 %, um dann relativ schnell (nach 8 Minuten) auf 1900 % abzusinken. Danach stieg sie langsamer wieder auf die Höhe des ersten Maximums und blieb bis zum Versuchsende auf hohem Niveau. Nach 44 Minuten lag die Sekretionsrate bei 2400 %. Der initiale Anstieg nach der Zugabe von 10 mM KC war mit 3100 % größer als der bei KIC. Die Sekretion fiel dann allerdings auf ähnliche Werte wie bei KIC ab und das zweite Maximum lag ebenfalls auf der Höhe des KIC-Maximums. Zum Versuchsende sank die Sekretionsrate allerdings auf 1600 %. 10 mM PP und 10 mM KV zeigten ein vollkommen anderes Sekretionsprofil. Ihnen fehlte die zweite Phase der Insulinsekretion wie sie bei KIC und KC zu finden ist. 10 mM PP führte zu einem kurzzeitigen Anstieg der Sekretionsrate auf 2500 % (bei Minute 62,5), die danach steil abfiel und nach 22 Minuten nicht mehr von der Kontrolle zu unterscheiden war. Nach Zugabe von 10 mM KV stieg die Insulinsekretion kurzzeitig auf 1500 % (bei Minute 62,5) und lag damit signifikant unter den Werten von PP ($p < 0,05$), KIC ($p < 0,05$) oder KC ($p < 0,02$). Bereits nach 10 Minuten war sie sehr stark abgefallen. Die mittlere relative Sekretionsrate von Minute 82 bis zum Ende des Versuches war bei KV sehr gering, aber signifikant höher als bei PP ($p < 0,01$). 10 mM KIV führte unter diesen Bedingungen nur zu einem sehr geringen, aber im Vergleich zur Kontrolle signifikanten Anstieg der Insulinsekretion (240 % nach 3 Minuten, $p < 0,02$). Ab Minute 74 war kein Unterschied zur Kontrolle mehr vorhanden. 10 mM n-C steigerte die Insulinsekretion bei Abwesenheit eines Substrates oder anderen Stimulators nicht. Der Zusatz von 0,1 mM Meglitinid, einem Sulfonylharnstoff-Analogen, steigerte die Insulinsekretion nach 3 Minuten auf etwa 300 %. Die gesteigerte Sekretionsrate fiel jedoch relativ schnell wieder ab und lag von Minute 82 bis zum Ende des Versuches nur leicht, aber signifikant ($p < 0,02$), über der Sekretionsrate der Kontrollversuche.

Wie bei den Versuchen bei Anwesenheit von Glipizid (vgl. 4.1.1 und 4.1.2) war KIC auch bei Abwesenheit eines anderen Stimulators am stärksten wirksam, gefolgt von KC. PP und KV zeigten noch eine deutliche Wirkung, während KIV und n-C (fast) keine sekretionssteigernde Wirkung mehr hatten.

Die Reihenfolge der Stärke der Sekretionssteigerung auf Basis der mittleren relativen Sekretionsrate pro Minute pro Insel (in Klammern angegeben) berechnet aus der Fläche unter der Kurve war: KIC (2381 %) > KC (2067 %) > PP (275 %) \approx KV (302 %) > Meglitinid (151 %) > KIV (107 %) \approx n-C (114 %) \approx Kontrolle (94 %)

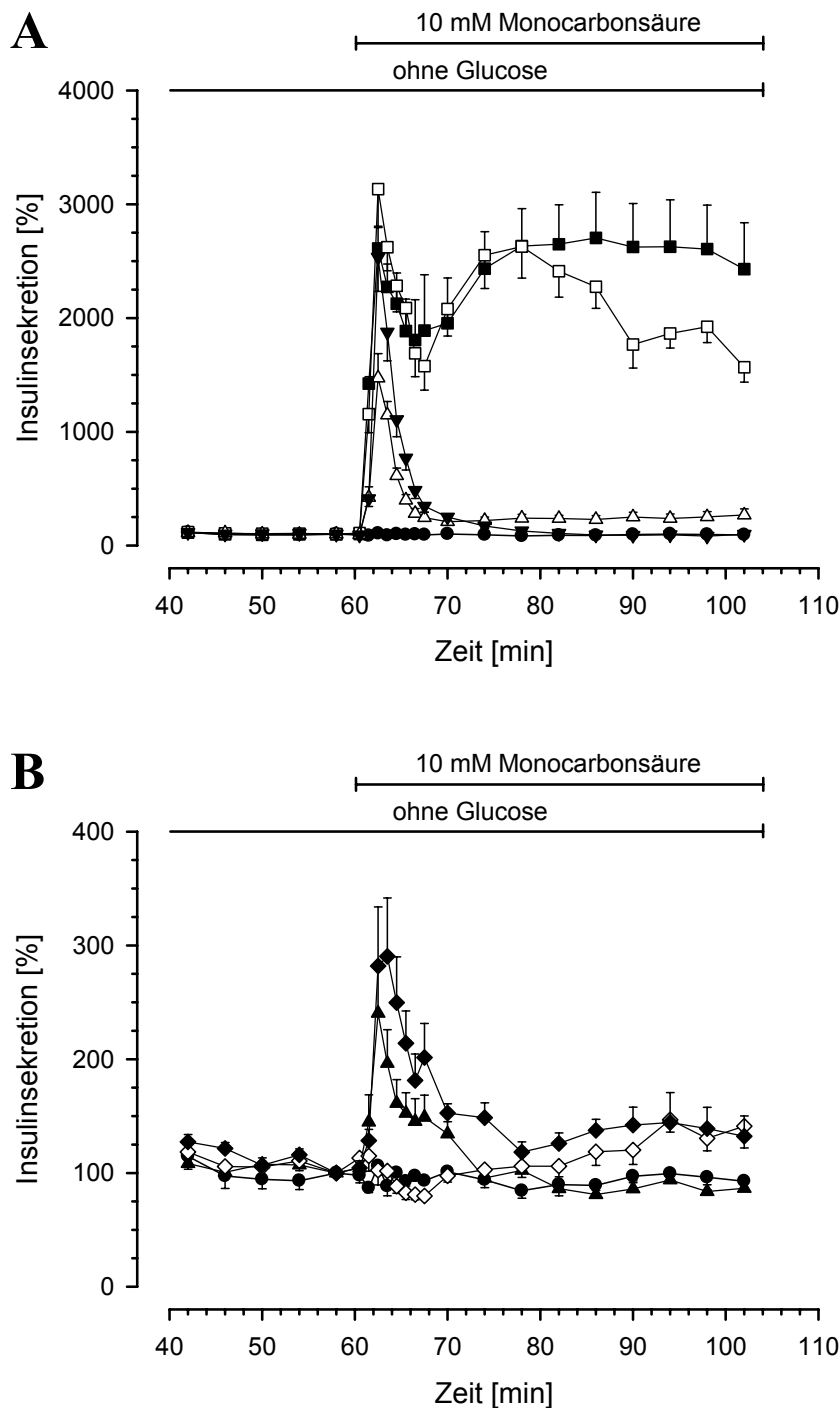


Abb. 4.4 *Stimulation der Insulinsekretion durch Monocarbonsäuren bei Abwesenheit eines anderen Substrates oder Stimulators.* Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1–104) mit reinem KRHA-Medium umströmt.

A Nach 60 Minuten wurden entweder KIC (■), KC (□), PP (▼) oder KV (△) (jeweils in einer Konzentration von 10 mM) hinzugefügt.

B Nach 60 Minuten wurden entweder 0,1 mM Meglitinid (◆), 10 mM KIV (▲) oder 10 mM n-C (◇) hinzugefügt.

Es wurden auch Kontrollversuche ohne Zugabe einer Monocarbonsäure (●) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 6–8 Einzelversuchen + oder – SEM der relativen Insulinsekretionsrate (Prozent) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten. Als Bezugswert diente die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor Zugabe der Testmedien (Minute 58 = 100 %).

4.1.4 Stimulation der Insulinsekretion bei Anwesenheit von 10 mM Glucose und Abwesenheit von Glipizid

In Abb. 4.5 ist die Insulinsekretion von Maus-Pankreasinseln bei Anwesenheit von Glucose und Abwesenheit von Glipizid dargestellt. 60 Minuten nach Beginn der Perifusion mit 10 mM Glucose lag die Insulinsekretion bei $9,6 \pm 0,6$ pg Insulin pro Minute pro Insel (aus allen 38 Versuchen der Abb. 4.5). Wie bei den Versuchen mit zusätzlicher Anwesenheit von Glipizid verlief der durch die Monocarbonsäuren ausgelöste Anstieg der Insulinsekretion bei Anwesenheit von Glucose langsamer als bei Abwesenheit von Glucose (Abb. 4.4). Im Gegensatz zu allen anderen Versuchsanordnungen war unter diesen Bedingungen KC am stärksten wirksam. 14 Minuten nach Zugabe von 10 mM KC stieg die Sekretionsrate auf 3900 % und fiel zum Ende des Versuches auf 2600 % ab. 10 mM KIC steigerte die Insulinsekretion nach 14 Minuten auf 3200 % und zeigte nur einen leichten Abfall nach 44 Minuten auf 2500 %. 10 mM KV führte über die gesamte Testperiode zu einem kontinuierlichen Anstieg der Insulinsekretion und erreichte erst nach etwa 26 Minuten ein Plateau bei 2900 %. Durch Zugabe von 10 mM PP stieg die Insulinsekretion nach 10 Minuten auf 1250 % an und fiel dann bis zum Ende des Versuches kontinuierlich auf 600 % ab. Als Reaktion auf 10 mM KIV stieg die Insulinsekretion nur vorübergehend auf 700 % an, fiel nach 7 Minuten auf 200 % ab und stieg während der restlichen Testperiode nur noch leicht auf 360 % an.

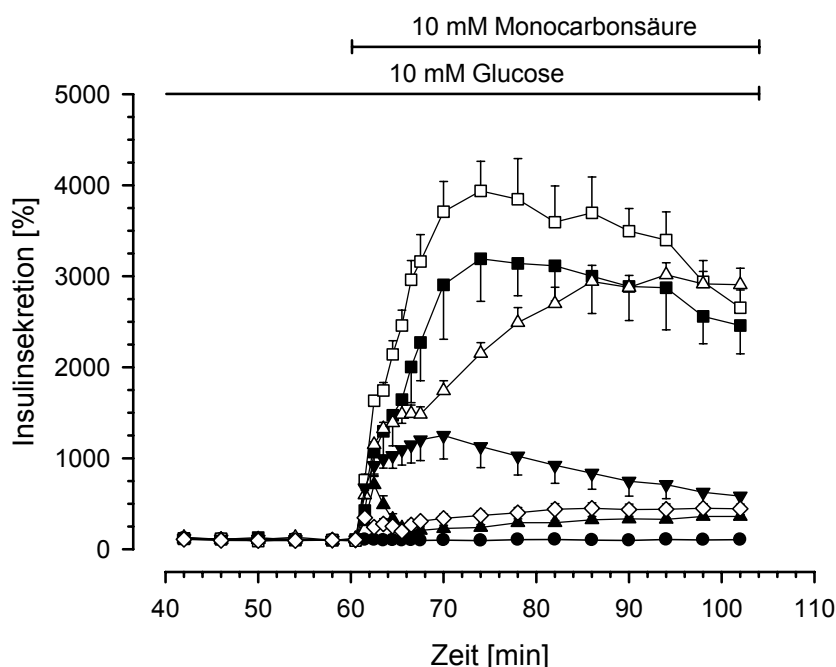


Abb. 4.5 *Stimulation der Insulinsekretion durch Monocarbonsäuren bei Anwesenheit von 10 mM Glucose.* Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1 – 104) mit Basismedium umströmt, das 10 mM Glucose enthielt. Nach 60 Minuten wurden entweder KIC (■), KC (□), KIV (▲), KV (△), PP (▼) oder n-C (◇) (jeweils in einer Konzentration von 10 mM) hinzugefügt. Es wurden auch Kontrollversuche ohne Zugabe einer Monocarbonsäure (●) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte

aus 4 – 8 Einzelversuchen + oder – SEM der relativen Insulinsekretionsrate (Prozent) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten. Als Bezugswert diente die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor Zugabe der Testmedien (Minute 58 = 100 %). 4 der 8 Versuche mit 10 mM PP wurden bereits von Frau Hastedt hier am Institut durchgeführt (HASTEDT, 2003).

Durch Zugabe von 10 mM n-C wurde die Insulinsekretion auf 350 % gesteigert und blieb, nach einem vorübergehenden Abfall auf 200 % nach 6 Minuten, auf einem Niveau von 450 % bis zum Versuchsende. In der Rangfolge der sekretionssteigernden Wirkung lag bei den Versuchen bei Anwesenheit einer stimulatorischen Glucose-Konzentration KC vor seinem Isomer KIC. KV steigerte die Insulinsekretion ebenfalls sehr stark, während KIV in dieser Versuchsanordnung am schwächsten wirksam war. PP zeigte eine deutliche Sekretionssteigerung und auch n-C führte zu einem Anstieg der Insulinsekretion.

Die Reihenfolge der Stärke der Sekretionssteigerung auf Basis der mittleren relativen Sekretionsrate pro Minute pro Insel (in Klammern angegeben) berechnet aus der Fläche unter der Kurve war: KC (3183 %) > KIC (2609 %) > KV (2363 %) > PP (875 %) > n-C (388 %) > KIV (310 %) > Kontrolle (101 %)

4.1.5 Einfluss von Meglitinid auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion

Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß die Metabolismus-induzierte Sekretionssteigerung bei Anwesenheit stimulierender Glucose-Konzentrationen durch eine zusätzliche direkte Hemmung der K_{ATP} -Kanäle gesteigert werden kann, wurden Perfusionen mit dem Sulfonylharnstoff-Analogon Meglitinid durchgeführt. Dieses steigert die Insulinsekretion ausschließlich durch Schließung der K_{ATP} -Kanäle, während für Glipizid auch ein direkter Effekt auf die Exocytose-Maschinerie der β -Zelle diskutiert wird (ELIASSON et al., 1996; FUHLENDORFF et al., 1998).

Bei Anwesenheit stimulierender Glucose-Konzentrationen steigerte 0,5 μ M Meglitinid die Insulinsekretion der Inseln fast nicht (Abb. 4.6). Diese Konzentration entspricht unter Berücksichtigung der Albuminbindung im Perfusionsmedium einer freien Konzentration, die in patch clamp Experimenten 20 % der K_{ATP} -Kanäle schließt (ZÜNKLER et al., 1988; PANTEN et al., 1989; SCHWANSTECHEER et al., 1994).

Nach Zugabe von 2,5 μ M Meglitinid kam es bei Anwesenheit von 10 mM Glucose zu einem kurzen Anstieg auf 400 %, der bereits nach 2 Minuten auf stabile 200 % zurückging. Nach Vorinkubation mit 17 mM Glucose entfiel der initiale Anstieg, und die Sekretion wurde während der gesamten Testperiode auf etwa 200 % gesteigert. In patch clamp Experimenten führte die entsprechende freie Konzentration zu einer Schließung von 50 % der K_{ATP} -Kanäle (ZÜNKLER et al., 1988; PANTEN et al., 1989; SCHWANSTECHEER et al., 1994).

Der Maximaleffekt als Antwort auf 15 μ M Meglitinid (> 90 % der K_{ATP} -Kanäle sind geschlossen) führte bei 10 mM Glucose im Basismedium zu einem Anstieg der Sekretionsrate um rund 900 % und blieb dann bis zum Ende des Versuches auf diesem hohem Niveau. Bei Anwesenheit von 17 mM Glucose wurde die Insulinsekretion durch 15 μ M Meglitinid über die gesamte Versuchsdauer auf 300 % gesteigert.

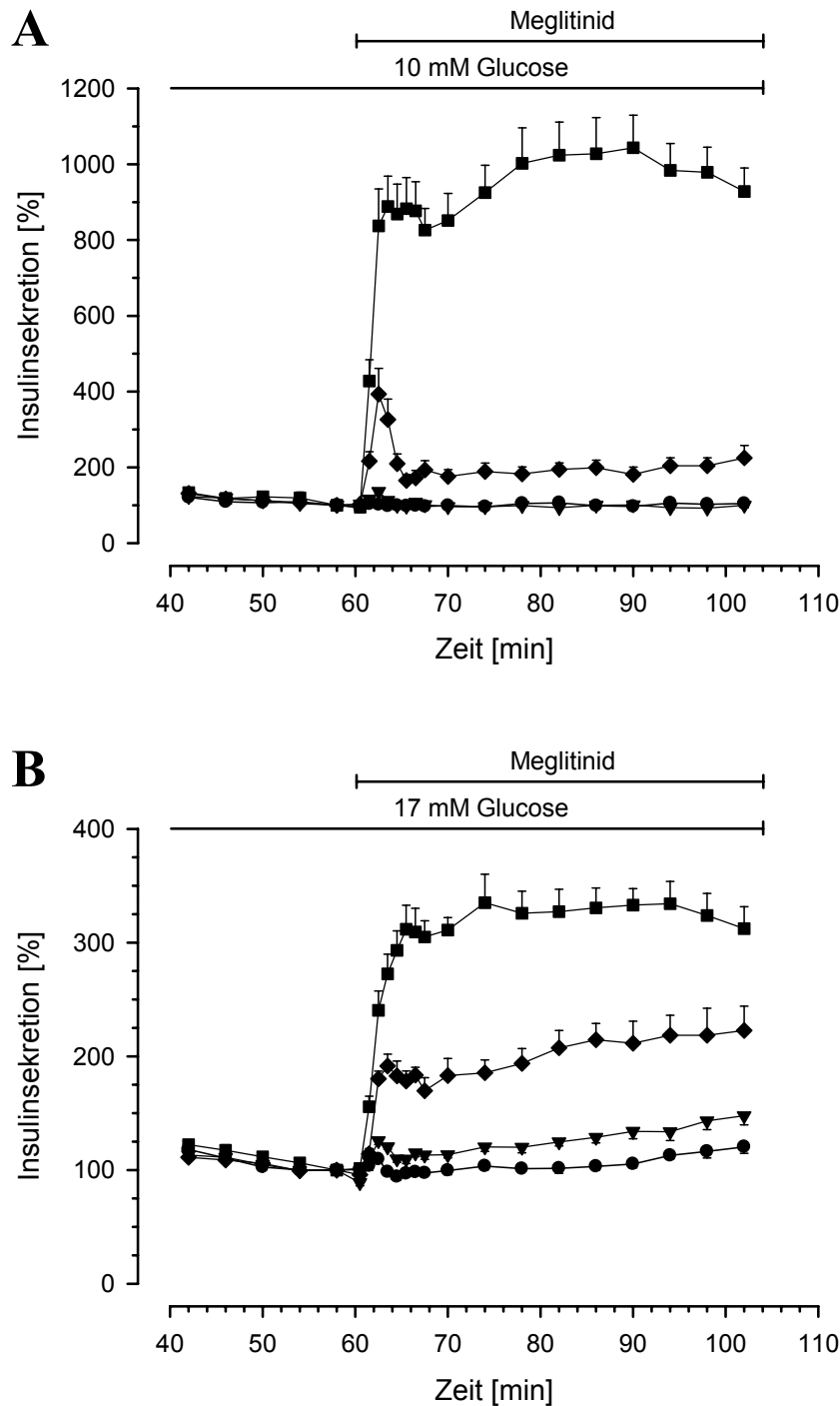


Abb. 4.6 Einfluss von Meglitinid auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion

Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1 – 104) mit Basismedium umströmt, das 10 mM Glucose (A) oder 17 mM Glucose (B) enthielt. Nach 60 Minuten wurden entweder 0,5 μ M (\blacktriangledown), 2,5 μ M (\blacklozenge) oder 15 μ M (\blacksquare) Meglitinid hinzugefügt. Es wurden auch Kontrollversuche ohne Zugabe von Meglitinid (\bullet) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 – 7 Einzelversuchen + oder – SEM der relativen Insulinsekretionsrate (Prozent) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten. Als Bezugswert diente die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor Zugabe der Testmedien (Minute 58 = 100 %).

4.1.6 Einfluss von TEA auf die Insulinsekretion

Neben den ATP-abhängigen Kalium-Kanälen gibt es in der β -Zelle des Pankreas noch spannungsabhängige und calciumabhängige spannungsabhängige Kalium-Kanäle (ASHCROFT und RORSMAN, 1989). Um zu untersuchen, welchen Einfluss das Schließen dieser Kanäle auf die Insulinsekretion der β -Zelle bei maximal geschlossenen K_{ATP} -Kanälen hat, wurden Perfusionen mit TEA (Tetraethylammoniumchlorid), einem Hemmstoff der beiden spannungsabhängigen Kalium-Kanaltypen, durchgeführt (Abb. 4.7).

Nach Vorinkubation mit $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid im Basismedium sank die Insulinsekretion nach Zugabe von 10 mM TEA innerhalb von 14 Minuten auf 40 % im Vergleich zur Rate am Ende der Kontrollperiode und blieb über die gesamte Testperiode auf diesem Niveau.

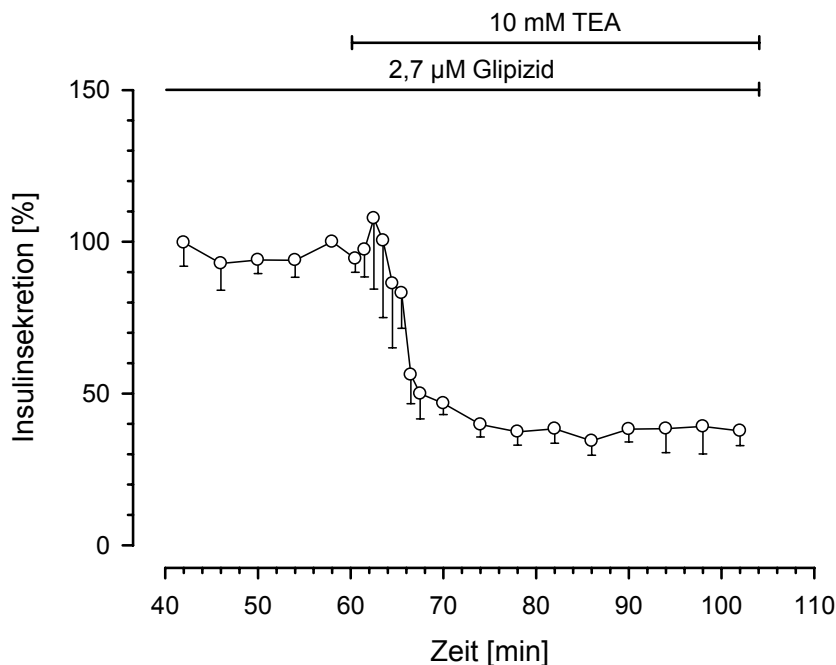
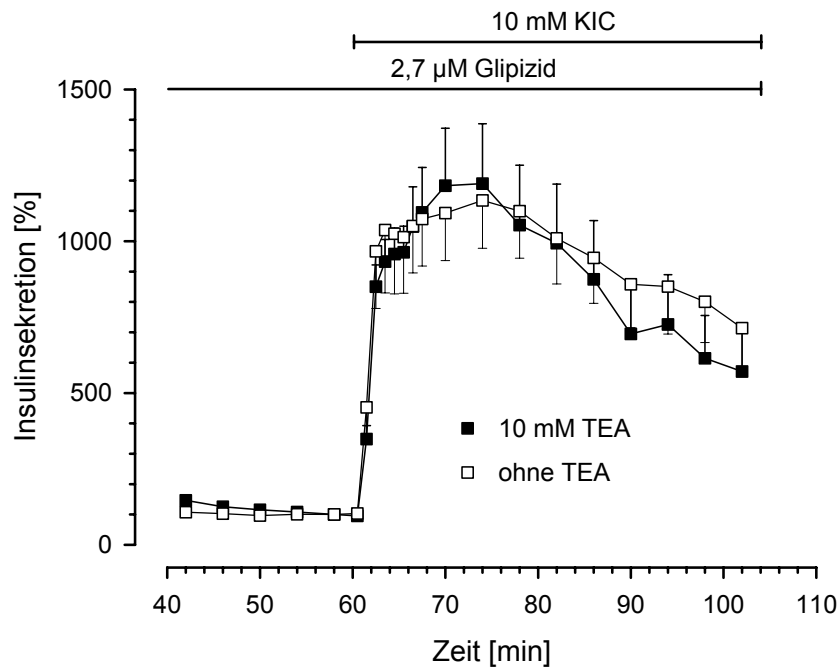


Abb. 4.7 Einfluss von TEA auf die K_{ATP} -Kanal-unabhängige Insulinsekretion. Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1 – 104) mit Basismedium umströmt, das $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid enthielt. Nach 60 Minuten wurden 10 mM TEA hinzugefügt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen minus SEM der relativen Insulinsekretionsrate (Prozent) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten. Als Bezugswert diente die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor Zugabe des Testmediums (Minute 58 = 100 %).

Um zu untersuchen, ob die sekretionssteigernde Wirkung von KIC auf eine Interaktion mit den Kalium-Kanälen, die durch TEA blockierbar sind, zurückzuführen ist, wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Inseln vor Zugabe von 10 mM KIC mit $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid und 10 mM TEA perfundiert wurden (Abb. 4.8).

Die mittlere Insulinsekretionsrate der 6 Versuche lag 60 Minuten nach der Perfusion mit $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid und 10 mM TEA bei $6,7 \pm 0,9 \text{ pg}$ Insulin pro Minute pro Insel. Nach Zugabe von 10 mM KIC stieg die Insulinsekretion nach 10 Minuten auf 1200 % und ging dann kontinuierlich auf 570 % am Ende des Versuches zurück. Die Anwesenheit von TEA neben Glipizid hatte somit keinen deutlichen Einfluss auf die Sekretionssteigerung durch KIC, im Vergleich zu den Versuchen mit alleiniger Anwesenheit von Glipizid (Abb. 4.1).



Zugabe des Testmediums (Minute 58 = 100 %). Die Kurve ohne TEA (\square) ist aus Abb. 4.1 entnommen.

Abb. 4.8 *Wirkung von KIC auf die Insulinsekretion bei Anwesenheit von TEA und Glipizid.* Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1–104) mit Basismedium umströmt, das 2,7 μ M Glipizid und 10 mM TEA (\blacksquare) enthielt. Nach 60 Minuten wurden 10 mM KIC hinzugefügt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 Einzelversuchen plus SEM der relativen Insulinsekretionsrate (Prozent) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten. Als Bezugswert diente die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor

4.1.7 Hemmung der α -Ketomonocarbonsäure-induzierten Insulinsekretion durch AOA

Bei der Steigerung der Insulinsekretion durch α -Ketomonocarbonsäuren scheint die Transaminierung mit Glutamat unter Bildung der entsprechenden Aminosäuren und α -Ketoglutarat eine wichtige Rolle zu spielen (MALAISSE et al., 1983; LENZEN et al., 1986).

Um die Bedeutung der Transaminierung für die sekretionssteigernde Wirkung der α -Ketomonocarbonsäuren zu untersuchen, wurde AOA (Aminooxyessigsäure) als Transaminasen-Hemmstoff eingesetzt.

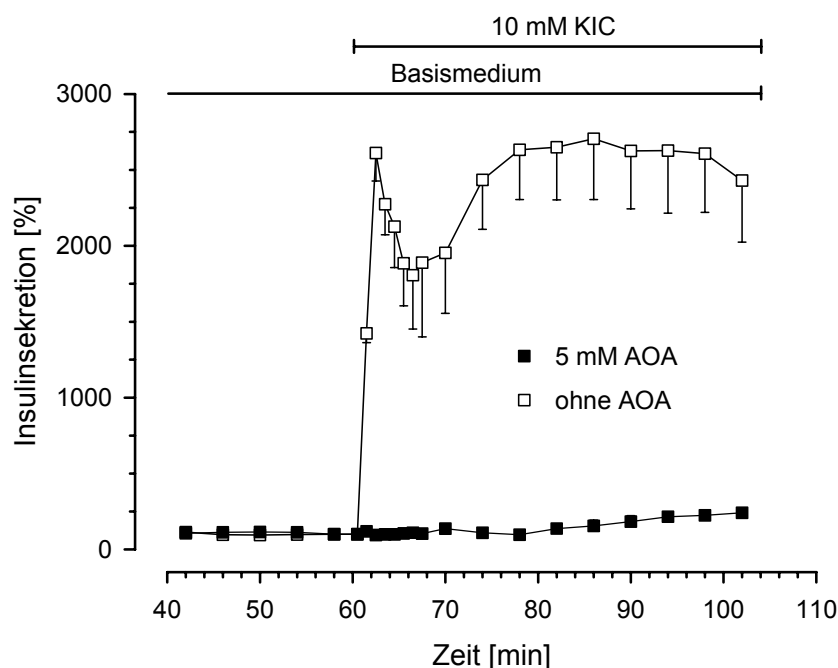


Abb. 4.9 *Hemmung der KIC-induzierten Sekretionssteigerung durch AOA.* Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1–104) mit Basismedium umströmt, das 5 mM AOA (\blacksquare) enthielt. Nach 60 Minuten wurden 10 mM KIC hinzugefügt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Einzelversuchen minus SEM der relativen Insulinsekretionsrate (Prozent) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten. Als Bezugswert diente die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor Zugabe des Testmediums (Minute 58 = 100 %). Die Kurve ohne AOA (\square) ist aus Abb. 4.4 entnommen.

In Maus-Pankreasinseln, die bei Abwesenheit jeglichen Substrates unter Zusatz von 5 mM AOA perifundiert wurden, konnte KIC keine Steigerung der Insulinsekretion mehr auslösen (Abb. 4.9).

Zur Klärung der Frage, ob AOA auch die sekretionssteigernde Wirkung der α -Ketomonocarbonsäuren bei vollständig blockierten K_{ATP} -Kanälen hemmt, wurden Perfusionen durchgeführt, in denen die Inseln zunächst 60 Minuten mit 2,7 μ M Glipizid und 5 mM AOA perifundiert wurden. Am Ende dieser Kontrollperiode betrug die Insulinsekretion $14,2 \pm 2,1$ pg Insulin pro Minute pro Insel ($n=17$, alle Versuche aus Abb. 4.10).

Wie bereits bei Abwesenheit von Glipizid (Abb. 4.9) verhinderte AOA auch hier die Steigerung der Insulinsekretion durch 10 mM KIC. Auch der bei alleiniger Anwesenheit von Glipizid vorhandene Anstieg der Insulinsekretion nach Zugabe von 10 mM PP (Abb. 4.1) wurde durch die Anwesenheit von AOA unterbunden. Die Wirkung von 10 mM KIV wurde deutlich geschwächt. Nach 4 Minuten lag die Steigerung der Sekretion nur bei 250 % im Gegensatz zu 600 % ohne AOA (Abb. 4.1).

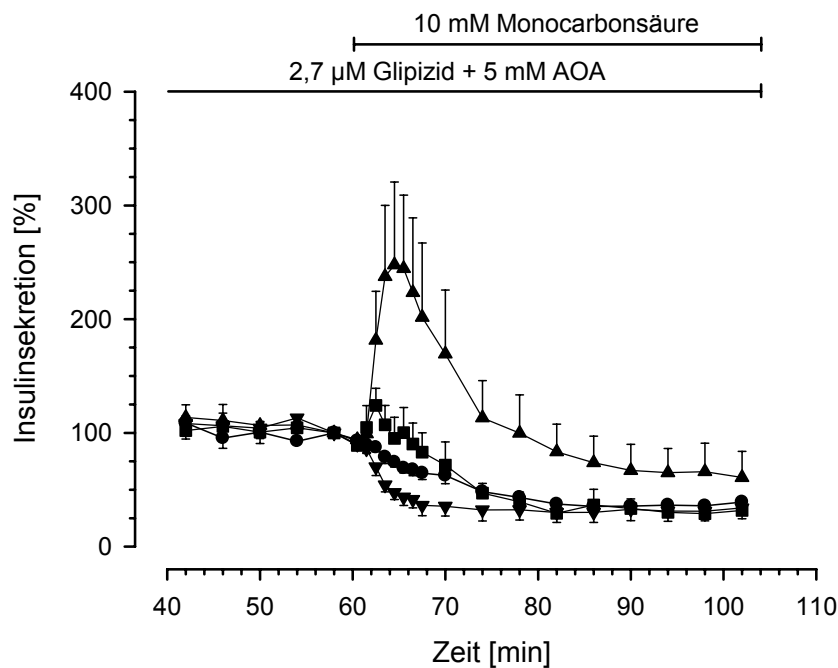


Abb. 4.10 AOA hemmt die K_{ATP} -Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion durch Monocarbonsäuren. Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1 – 104) mit Basismedium umströmt, das 2,7 μ M Glipizid + 5 mM AOA enthielt. Nach 60 Minuten wurden entweder KIC (■), KIV (▲) oder PP (▼) (jeweils in einer Konzentration von 10 mM) hinzugefügt. Es wurden auch Kontrollversuche ohne Zugabe einer Monocarbonsäure (●) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 – 5 Einzelversuchen

+ oder – SEM der relativen Insulinsekretionsrate (Prozent) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten. Als Bezugswert diente die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor Zugabe der Testmedien (Minute 58 = 100 %).

4.1.8 Hemmung der KIC-induzierten Insulinsekretion durch D-600

Um zu prüfen, ob die KIC-induzierte Stimulation der Insulinsekretion Exocytose widerspiegelt und kein Artefakt aufgrund von Zellschädigung ist, wurden Versuche mit D-600 durchgeführt. D-600 [(±)-Methoxyverapamil-Hydrochlorid] hemmt spannungsabhängige L-Typ Calcium-Kanäle, die für den Calciumeinstrom in die β -Zelle als Folge der Depolarisation der Plasmamembran verantwortlich sind.

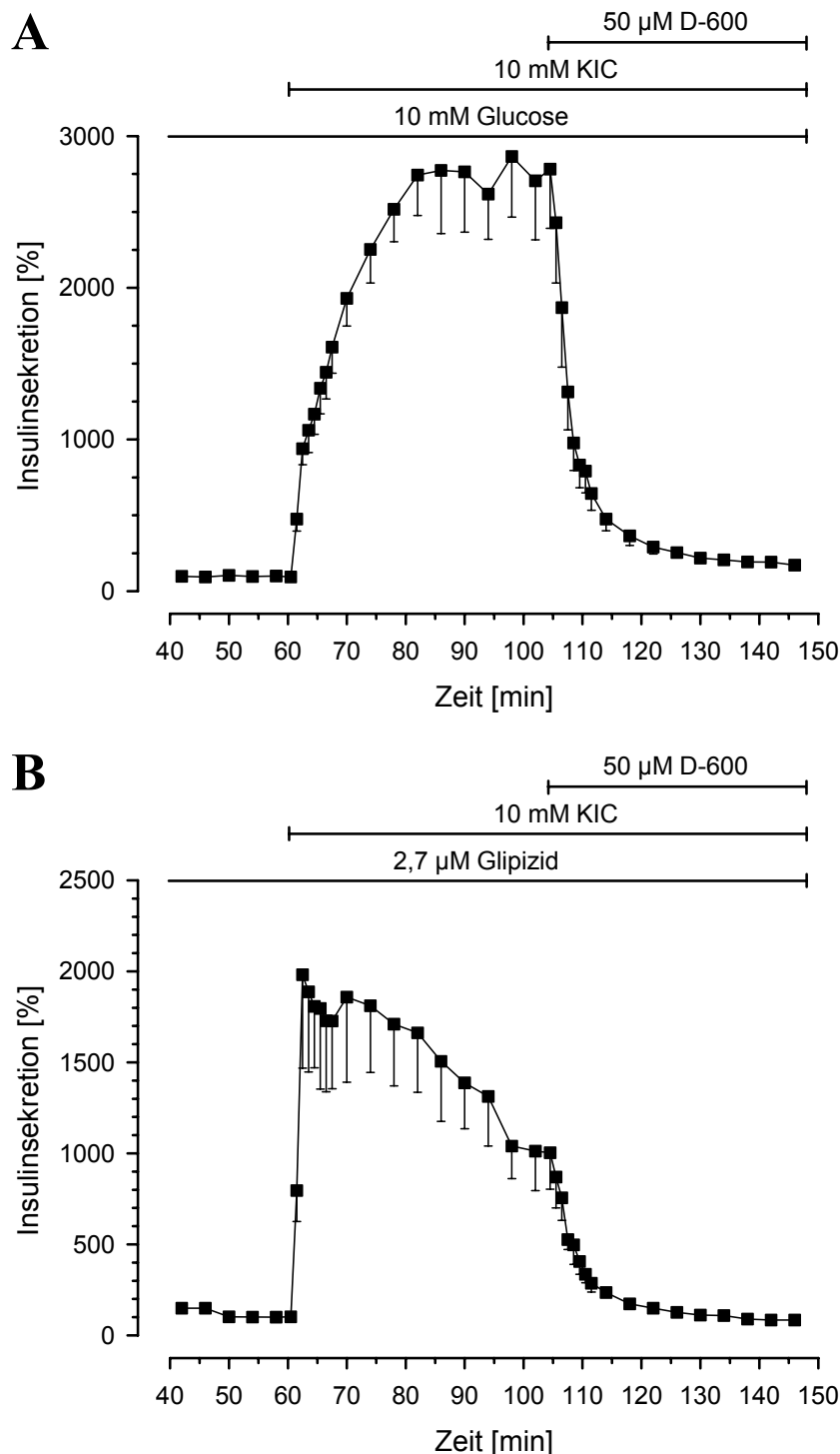


Abb. 4.11 Hemmung der KIC-induzierten Insulinsekretion durch D-600. Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1 – 148) mit Basismedium umströmt, das 10 mM Glucose (A) oder 2,7 µM Glipizid (B) enthielt. Nach 60 Minuten wurden 10 mM KIC hinzugefügt. Nach weiteren 44 Minuten erfolgte die Zugabe von 50 µM D-600. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 bzw. 4 Einzelversuchen minus SEM der relativen Insulinsekretionsrate (Prozent) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten. Als Bezugswert diente die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor Zugabe des KIC (Minute 58 = 100 %).

Die isolierten Maus-Pankreasinseln wurden zunächst für 60 Minuten mit 10 mM Glucose (Abb. 4.11 A) oder 2,7 μ M Glipizid (Abb. 4.11 B) perifundiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 mM KIC und nach weiteren 44 Minuten die zusätzliche Applikation von 50 μ M D-600. In beiden Fällen wurde die KIC-induzierte Stimulation der Insulinsekretion durch die Zufuhr von D-600 rasch und nahezu vollständig antagonisiert. Dies zeigt, dass die B-Zellen noch intakt waren und es sich bei der KIC-induzierten Sekretionssteigerung um Exocytose von Insulin handelte.

4.1.9 Einfluss von Glucagon auf die KIC-induzierte Insulinsekretion

Glucagon kann bei Anwesenheit eines anderen Stimulators die Insulinsekretion steigern (PANTEN, 1987).

Um zu untersuchen, ob bei der K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Stimulation der Insulinsekretion durch 20 mM KIC eine Freisetzung von Glucagon aus α -Zellen der Pankreasinseln beteiligt ist, wurden Versuche durchgeführt, in denen auf Pankreasinseln vor KIC-Zugabe bereits 2,7 μ M Glipizid und 1 μ g/ml Glucagon einwirkten (Abb. 4.12). Sollte für die sekretionssteigernden Wirkung von KIC Glucagon-Freisetzung eine Rolle spielen, so wäre zu erwarten, dass KIC bei Anwesenheit von exogenem Glucagon eine abgeschwächte Insulin-sekretorische Antwort hervorbringt.

Die mittlere Insulinsekretionsrate aus 7 Versuchen betrug nach 60-minütiger Perifusion mit 2,7 μ M Glipizid und 1 μ g/ml Glucagon $34,7 \pm 3,2$ pg Insulin pro Minute pro Insel.

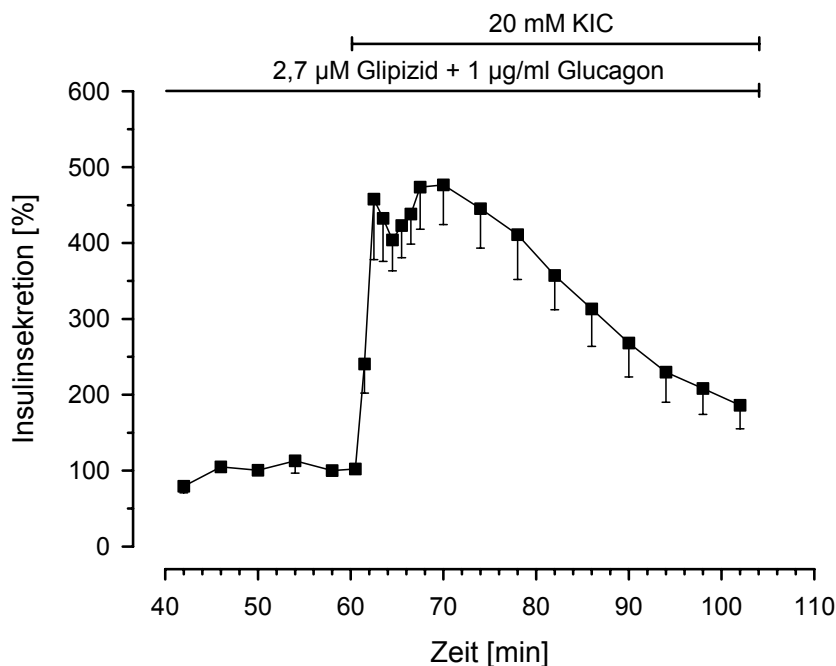


Abb. 4.12 K_{ATP} -Kanal-unabhängige Stimulation der Insulinsekretion durch KIC bei Anwesenheit von 1 μ g/ml Glucagon. Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1 – 104) mit Basismedium umströmt, das 2,7 μ M Glipizid und 1 μ g/ml Glucagon enthielt. Nach 60 Minuten wurden 20 mM KIC hinzugefügt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 7 Einzelversuchen minus SEM der relativen Insulinsekretionsrate (Prozent) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten. Als Bezugswert diente die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor Zugabe des Testmediums (Minute 58 = 100 %).

der letzten Fraktion vor Zugabe des Testmediums (Minute 58 = 100 %).

Die Wirkung von 20 mM KIC bei Anwesenheit von 2,7 μM Glipizid und 1 $\mu\text{g/ml}$ Glucagon fiel mit etwa 460 % nach 3 Minuten im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit von 2,7 μM Glipizid (830 % nach 3 Minuten, vgl. Abb. 4.2 B) geringer aus, war jedoch immer noch sehr stark und somit wahrscheinlich nicht Folge verstärkter Freisetzung von Glucagon.

4.2 Wirkung von Monocarbonsäuren auf die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase

Eine zentrale Reaktion im Citratcyclus ist die Umwandlung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA (LÖFFLER, 1997c). Diese Reaktion wird katalysiert durch das Enzym α -Ketoglutarat-Dehydrogenase. Um zu prüfen, ob die Monocarbonsäuren einen direkten Effekt auf dieses Enzym haben, wurden Versuche mit Bestimmung der Aktivität dieses Enzyms durchgeführt. Die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase wurde in Parallelversuchen mit den Monocarbonsäuren vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates α -Ketoglutarat gestartet. Als Maß der Aktivität der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase wurde die Absorption des entstandenen NADH gemessen. Zur quantitativen Auswertung wurde die Differenz zwischen der Absorption nach 15 Minuten Reaktionszeit und der Absorption bei Start der Reaktion ermittelt.

Testsubstanz	Anstieg der NADH-Absorption nach 15 Minuten		
	10 mM Testsubstanz 1 mM EGTA ohne Ca^{2+}	10 mM Testsubstanz ohne EGTA 0,5 mM Ca^{2+}	3 mM Testsubstanz ohne EGTA 0,5 mM Ca^{2+}
NaCl	0,114	0,026	0,020
KIC	0,008	0,007	0,002
KC	0,033	0,013	0,007
KIV	0,078	0,020	0,012
KV	0,074	0,020	0,015
PP	0,035	0,018	0,016
n-C	0,098	0,027	0,021

Tabelle 4.1 *Wirkung von Monocarbonsäuren auf die Aktivität der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase. Die Aktivität der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (15 mU/ml) wurde bei Anwesenheit der Testsubstanzen gemessen, indem der Anstieg der NADH-Absorption nach Zugabe des Substrates 15 Minuten lang registriert wurde. Die Werte pro Spalte geben die Absorptionsänderung eines typischen Einzelversuches an. Vor Zugabe des Substrates wurde die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase für 20 Minuten mit den Testsubstanzen vorinkubiert.*

Die Aktivität der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase ist abhängig von der Konzentration zweiwertiger Ionen im Medium, z. B. Ca^{2+} oder Mg^{2+} . Um diese Effekte zu verringern, wurden die Versuche bei Anwesenheit des Komplexbildners EGTA (1 mM) durchgeführt (Tabelle 4.1, Spalte 1). Bei Abwesenheit von Ca^{2+} führten die Monocarbonsäuren zu einer Hemmung der Enzymaktivität. Bei Anwesenheit von 10 mM KIC sank die Aktivität auf unter 10 % im Vergleich zur Kontrolle (10 mM NaCl). 10 mM KC und 10 mM PP senkten die Aktivität auf etwa 30 %. Durch 10 mM KV und 10 mM KIV wurde die Aktivität des Enzyms auf 65 – 70 % verringert. 10 mM n-C führte zu einer Reduktion der Aktivität auf 86 %.

Zur Untersuchung, ob die Effekte der Monocarbonsäuren auf die Aktivität des Enzyms abhängig von Calcium-Ionen sind, wurden auch Versuche ohne EGTA und mit 0,5 mM Ca^{2+} durchgeführt (Tabelle 4.1, Spalte 2). In diesen Versuchen fiel die Hemmung der Enzymaktivität schwächer aus als bei Abwesenheit von Ca^{2+} . Die Reihenfolge der Effektstärke der einzelnen Testsubstanzen war aber dieselbe wie bei den Versuchen ohne Ca^{2+} . 10 mM KIC verringerte die Aktivität auf 26 %, 10 mM KC auf 50 % und 10 mM PP auf 68 %. KIV und KV senkten die Aktivität auf 75 %. Im Gegensatz zu den Versuchen ohne Ca^{2+} hatte n-C keinen hemmenden Effekt auf die Enzymaktivität.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung durch Monocarbonsäuren wurde durch Versuche mit 3 mM Testsubstanzen geprüft (Tabelle 4.1, Spalte 3). Auch bei dieser niedrigeren Konzentration wurde Enzymhemmung beobachtet. Bei Anwesenheit von 3 mM KIC betrug die Enzymaktivität nur 11 % im Vergleich zur Kontrolle. Die geringere Konzentration zeigte damit sogar eine stärkere Hemmwirkung als 10 mM KIC. Mit einer Senkung auf 33 % bzw. 62 % waren auch KC und KIV in geringerer Konzentration stärker wirksam als in hoher Konzentration. Nur bei PP führte eine Verringerung der Konzentration auch zu einer niedrigeren Hemmung der Enzymaktivität (Aktivitätsminderung bei 10 mM PP um 32 %, bei 3 mM PP um 22 %). Der Einfluss von KV und n-C auf die Enzymaktivität zeigte keine Konzentrationsabhängigkeit.

Um den Einfluss der Vorinkubationsdauer zu untersuchen, wurden im Folgenden Versuche durchgeführt, bei denen das Enzym vor Zugabe des Substrates nur für 5 Minuten mit den Testsubstanzen inkubiert wurde.

Die Verkürzung der Vorinkubationszeit führte zu insgesamt höherer Enzymaktivität (Tabelle 4.2, Spalte 1). Bei den Versuchen ohne Ca^{2+} lag die Aktivität des Enzyms bei Anwesenheit von 3 mM KC nach 15 Minuten nur noch bei etwa 60 % im Vergleich zur Kontrolle. 3 mM KIC führte zu einem Aktivitätsverlust auf knapp 70 %. Durch 3 mM KIV oder PP wurde die Aktivität auf etwa 80 – 90 % gesenkt. 3 mM KV dagegen verringerte die Aktivität fast nicht. Im Gegensatz zur Hemmung durch die α -Ketosäuren, führte 3 mM n-C zu einer leichten Steigerung der Enzymaktivität.

Wurde die dreifache Konzentration des Enzyms eingesetzt, so stiegen die Absolutwerte der Absorptionsänderung (Tabelle 4.2, Spalte 2). Der relative Effekt der Testsubstanzen auf die Enzymaktivität unterschied sich jedoch in seiner Reihenfolge nicht von den Versuchen mit der geringeren Enzymkonzentration.

Zur Untersuchung des Einflusses von Ca^{2+} wurden Versuche durchgeführt, bei denen neben 1 mM EGTA auch Ca^{2+} hinzugefügt wurde (Tabelle 4.2, Spalte 3). Die eingesetzte Konzentration von 1,1 mM Ca^{2+} entsprach einer freien Konzentration von 0,1 mM (BERS, 1982). In diesen Versuchen zeigte 3 mM KIC den stärksten Hemmeffekt. Die Aktivität des Enzyms sank auf etwa 40 % ab. Im Gegensatz zu den Versuchen ohne Ca^{2+} verringerte 3 mM KV die Enzymaktivität bei Anwesenheit von Ca^{2+} auf 84 %. Der Effekt von 3 mM KC, KIV, PP und n-C unterschied sich praktisch nicht von dem Effekt bei Abwesenheit von Ca^{2+} .

Testsubstanz	Anstieg der NADH-Absorption nach 15 Minuten		
	Enzym 15 mU/ml 1 mM EGTA ohne Calcium	Enzym 45 mU/ml 1 mM EGTA ohne Calcium	Enzym 45 mU/ml 1 mM EGTA 0,1 mM Calcium (frei)
3 mM NaCl	0,173 ± 0,006	0,411 ± 0,030	0,376 ± 0,000
3 mM KIC	0,123 ± 0,006	0,302 ± 0,021	0,154 ± 0,025
3 mM KC	0,102 ± 0,004	0,239 ± 0,017	0,210 ± 0,006
3 mM KIV	0,143 ± 0,005	0,329 ± 0,019	0,302 ± 0,004
3 mM KV	0,167 ± 0,008	0,398 ± 0,019	0,315 ± 0,002
3 mM PP	0,153 ± 0,003	0,372 ± 0,018	0,325 ± 0,005
3 mM n-C	0,189 ± 0,009	0,434 ± 0,019	0,385 ± 0,002

Tabelle 4.2 *Wirkung von Monocarbonsäuren auf die Aktivität der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase.* Die Aktivität der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase wurde bei Anwesenheit der Testsubstanzen gemessen, indem der Anstieg der NADH-Absorption nach Zugabe des Substrates 15 Minuten lang registriert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (aus 2 – 3 Versuchen pro Spalte) der Absorptionsänderung. Vor Zugabe des Substrates wurde die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase für 5 Minuten mit den Testsubstanzen vorinkubiert.

4.3 Selektive Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion bei Anwesenheit des Sulfonylharnstoffs Glipizid

4.3.1 Vergleich der sekretionssteigernden Wirkung von Glucose und KIC

Bereits seit längerer Zeit ist bekannt, dass KIC die Insulinsekretion auch dann steigert, wenn kein weiterer Nährstoff oder Stimulator der Insulinsekretion anwesend ist (PANTEN et al., 1972). Diese KIC-Wirkung wurde mit der Wirkung von Glucose verglichen, und zwar sowohl an Maus-Pankreasinseln mit aktiven K_{ATP} -Kanälen als auch an Maus-Pankreasinseln, deren K_{ATP} -Kanäle durch $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid vollständig blockiert waren.

Nach 60-minütiger Perifusion mit reinem KRHA-Medium (3.1.3) lag die mittlere Sekretionsrate bei $5,1 \pm 0,5 \text{ pg Insulin pro Minute pro Insel}$ ($n = 8$, Abb. 4.13 A). Die Zugabe von 30 mM Glucose führte zu einer biphasischen Sekretionssteigerung mit einem ersten Maximum von etwa $40 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ (nach 6 Minuten). Nach einem kurzzeitigen Abfall auf etwa $20 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ stieg die mittlere Sekretionsrate bis zum Ende des Versuches auf $115,0 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$.

Wurde dem Basismedium $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid zugesetzt, so betrug die mittlere Sekretionsrate am Ende der Kontrollperiode $12,7 \pm 2,0 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ ($n = 7$). Diese Ausgangsrate war signifikant höher ($p < 0,001$) als bei den entsprechenden Versuchen ohne Glipizid ($5,1 \pm 0,5 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$; Abb. 4.13 A). Der Zusatz von Glipizid zum Basismedium führte zu einem Verlust der Sekretionssteigerung durch 30 mM Glucose. 44 Minuten nach Zugabe von 30 mM Glucose lag die mittlere Sekretionsrate mit $8,4 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ sogar leicht unter der Sekretionsrate am Ende der Kontrollperiode.

Bei Anwesenheit von 10 mM Glucose im Basismedium betrug die mittlere Sekretionsrate nach 60-minütiger Perifusion $7,4 \pm 0,7 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ ($n = 4$). Die Erhöhung der Glucose-Konzentration auf 30 mM führte auch in diesem Fall zu einer biphasischen Sekretionssteigerung. Das erste Maximum war jedoch mit etwa $80 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ doppelt so hoch und wurde früher (nach 3 Minuten) erreicht als bei den Versuchen ohne Glucose im Basismedium. Nach vorübergehender Verringerung der Sekretionssteigerung auf etwa $50 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ erreichte die Sekretion am Ende des Versuches ein ähnliches Niveau ($133,3 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$) wie bei Abwesenheit von Glucose im Basismedium.

Wurde dem Basismedium neben 10 mM Glucose noch $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid zugesetzt, so lag die mittlere Sekretionsrate am Ende der Kontrollperiode bei $68,3 \pm 13,0 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ ($n = 5$). Nach Erhöhung der Glucose-Konzentration auf 30 mM stieg die mittlere Sekretion langsam an und erreichte nach 14 Minuten ein Plateau bei etwa $160 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$, das bis zum Ende des Versuches gehalten wurde.

Der Zusatz von 10 mM KIC verursachte nur in den Versuchen mit reinem KRHA-Medium einen leicht biphasischen Sekretionsanstieg (Abb. 4.13 B). Ausgehend von $4,1 \pm 0,3 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ ($n = 8$) stieg die Sekretion nach Zugabe von 10 mM KIC zunächst auf $108,0 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ (nach 3 Minuten). Nach einer vorübergehenden Senkung der Sekre-

tion auf $74,5 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ stieg die mittlere Sekretionsrate bis zum Ende des Versuches nur leicht auf $98,7 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$.

Bei vollständig geschlossenen K_{ATP} -Kanälen (durch $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid) stieg die mittlere Insulinsekretion nach Zugabe von 10 mM KIC innerhalb der ersten 4 Minuten von $11,1 \pm 1,4 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ ($n = 8$) auf etwa $120 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ an und blieb bis Minute 78 auf diesem Niveau. Danach fiel sie leicht ab, auf $85,9 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ am Ende des Versuches.

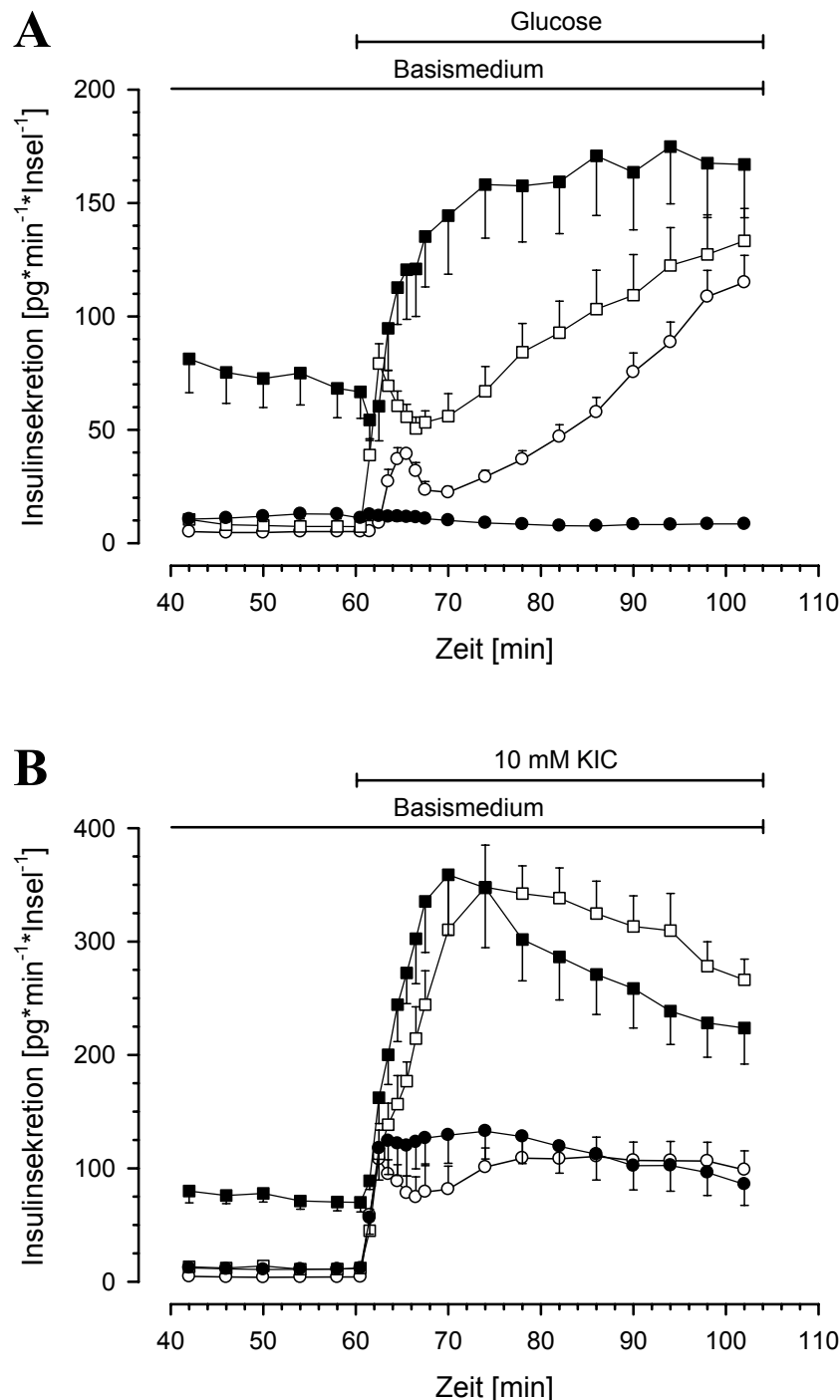


Abb. 4.13 *Stimulation der Insulinsekretion durch Glucose oder KIC in Abhängigkeit vom Kontrollmedium.* Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1–104) mit reinem KRHA-Medium (○) oder Basismedium mit Zusatz von 10 mM Glucose (□) oder $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid (●) oder gleichzeitig $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid und 10 mM Glucose (■) perfundiert. Das Testmedium enthielt ab Minute 61 entweder 30 mM Glucose (A) oder 10 mM KIC (B). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4–8 Einzelversuchen + oder – SEM der absoluten Insulinsekretionsrate (pg Insulin pro Minute pro Insel) in Abhängigkeit der Perfusionszeit in Minuten.

Wurden die Inseln vor Zugabe von 10 mM KIC mit 10 mM Glucose perfundiert, so fiel die Sekretionssteigerung deutlich stärker aus als bei Abwesenheit dieses Nährstoffes. Ausgehend von $11,1 \pm 0,9 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ ($n = 4$) stieg die mittlere Sekretionsrate 14 Minuten nach Zugabe von 10 mM KIC auf $347,8 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ und fiel bis zum Ende des Versuches auf $266,2 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ ab.

Die gleichzeitige Anwesenheit von 10 mM Glucose und $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid im Basismedium führte zu deutlich höheren mittleren Sekretionsraten am Ende der Kontrollperiode ($70,2 \pm 7,8 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$, $n = 6$) als bei den anderen drei Kontrollmedien. Die Sekretionssteigerung durch Zugabe von 10 mM KIC erreichte jedoch ähnliche Werte wie bei alleiniger Anwesenheit von 10 mM Glucose im Basismedium. 14 Minuten nach KIC-Zugabe betrug die mittlere Sekretionsrate $347,4 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$, am Ende des Versuches lag sie mit $223,7 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ etwas unter der mittleren Sekretionsrate bei alleiniger Anwesenheit von 10 mM Glucose im Basismedium.

Die Wirkung von 10 mM KIC auf die Insulinsekretion wurde also durch den Zusatz von $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid zum Basismedium sowohl bei An- als auch bei Abwesenheit von 10 mM Glucose nicht wesentlich beeinflusst.

4.3.2 Vergleich der sekretionssteigernden Wirkung von KIC, BCH und MMS bei Anwesenheit von Glipizid

Um zu untersuchen, warum bei Anwesenheit von Glipizid und Abwesenheit eines anderen Nährstoffes KIC im Gegensatz zu Glucose die Insulinsekretion stark steigern konnte, wurden Versuche mit BCH und MMS durchgeführt (Abb. 4.14).

Bei der Transaminierung von KIC entsteht Leucin, ein starker Aktivator der Glutamat-Dehydrogenase (GluDH; Gylfe, 1976; Sener und Malaisse, 1980). Die Glutamat-Dehydrogenase katalysiert die Bildung von α -Ketoglutarat aus Glutamat.

Ob an der starken sekretionssteigernden Wirkung von KIC eine Leucin-induzierte Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase beteiligt sein könnte, wurde durch Versuche mit dem Leucin-Analogon BCH (2-Aminobicyclo[2.2.1]heptan-2-carbonsäure) untersucht. Es wird nicht metabolisiert, aktiviert aber die Glutamat-Dehydrogenase ebenso wie Leucin (PANTEN und LANGER, 1981). Bei der eingesetzten Substanz handelte es sich um ein Gemisch aus 10 % (\pm)-a-BCH und 90 % (\pm)-b-BCH (CHRISTENSEN et al., 1969). Das aktive Isomer ist jedoch nur (-)-b-BCH, sodass nur 45 % der eingesetzten Konzentration wirksam waren.

Durch Zugabe von 10 mM BCH (entsprechend einer (-)-b-BCH-Konzentration von $4,5 \text{ mM}$) stieg die mittlere Insulinsekretion der isolierten Maus-Pankreasinseln, die bereits für 60 Minuten mit $2,7 \mu\text{M}$ Glipizid perfundiert worden waren, von $16,2 \pm 5,0 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ auf $83,2 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ nach 4 Minuten. Bis zum Ende der Perifusion fiel die Sekretionsrate wieder auf das Kontrollniveau vor Zugabe von BCH ab. 10 mM BCH konnte die Insulinsekretion damit zwar initial ähnlich stark steigern wie 10 mM KIC ($80,3 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ nach 4 Minuten) jedoch nicht so anhaltend.

Nach dem Transport in die β -Zelle stellt MMS (Monomethylsuccinat) durch Esterhydrolyse Succinat bereit. Durch Versuche mit MMS sollte geprüft werden, ob die Bereitstellung von Succinat die Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln bei Anwesenheit von Glipizid in ähnlichem Ausmaß steigert, wie die Bereitstellung von α -Ketoglutarat.

10 mM MMS steigerte die mittlere Insulinsekretion nur sehr mäßig und für kurze Zeit. Ausgehend von $8,6 \pm 1,0 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ stieg die mittlere Insulinsekretion 4 Minuten nach Zugabe der Testsubstanz auf $12,9 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$. Bereits nach weiteren 2 Minuten fiel sie jedoch wieder auf das Niveau vor Zugabe von MMS ab und erreichte am Ende des Versuches mit $4,5 \pm 0,4 \text{ pg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ sogar Werte unterhalb des Ausgangsniveaus.

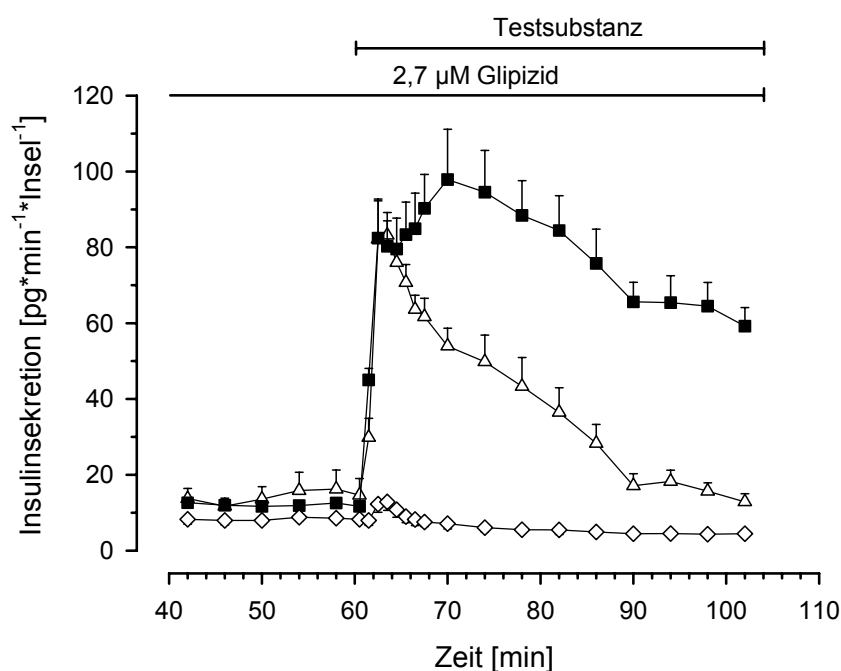


Abb. 4.14 *Vergleich der sekretionssteigernden Wirkung von KIC, BCH und MMS.* Die Inseln wurden über die gesamte Zeit (Minute 1 – 104) mit Basismedium umströmt, das 2,7 μM Glipizid enthielt. Nach 60 Minuten wurden entweder KIC (■), BCH (△) oder MMS (◇) (jeweils in einer Konzentration von 10 mM) hinzugefügt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 – 8 Einzelversuchen + oder – SEM der absoluten Insulinsekretionsrate (pg Insulin pro Minute pro Insel) in Abhängigkeit der Perifusionszeit in Minuten.

Aufgrund eines großen zeitlichen Abstandes zwischen den Versuchen mit 10 mM KIC aus Abb. 4.1 und Abb. 4.13 sowie den Versuchen mit BCH und MMS wurden für diesen Vergleich neue Versuche mit 10 mM KIC durchgeführt.

4.3.3 Wirkung von Glucose und KIC auf den Gehalt von ATP und ADP in Maus-Pankreasinseln

ATP und ADP sowie ihr Verhältnis ATP/ADP sind wichtige Faktoren für die Stimulus-Sekretions-Kopplung in der β -Zelle des Pankreas (HENQUIN, 2000; WOLLHEIM, 2000). Durch den Abbau von Nährstoffen wird im β -Zell-Cytosol der ATP-Gehalt gesteigert und der ADP-Gehalt gesenkt. Dies führt zur Schließung ATP-abhängiger Kalium-Kanäle in der Plasmamembran und dadurch letztendlich zur Ausschüttung von Insulin. Möglicherweise ist eine Veränderung des ATP- und ADP-Gehaltes auch bei der K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Sekretionssteigerung beteiligt (HENQUIN et al., 2003).

Um dies zu prüfen, wurde der Gehalt von ATP und ADP in isolierten Maus-Pankreasinseln bestimmt. In Analogie zu den Perifusionsversuchen erfolgte vor Zugabe von 30 mM Glucose bzw. 10 mM KIC eine 60-minütige Vorinkubation mit reinem Basismedium. Daran schloss sich eine 40-minütige Hauptinkubation mit dem Nährstoff an. Zur Kontrolle wurden parallel Versuche durchgeführt, in denen während der Hauptinkubation dem Basismedium keine Glucose oder α -Ketoisocaproinsäure zugesetzt wurde (Tabelle 4.3). Sowohl 30 mM Glucose als auch 10 mM KIC steigerten den ATP-Gehalt signifikant, senkten den ADP-Gehalt signifikant und steigerten das ATP/ADP-Verhältnis. Allerdings waren die entsprechenden Änderungen (Test minus Kontrolle) für Glucose und KIC nicht verschieden ($p > 0,05$).

	Vor-inkubation	Haupt-inkubation	Versuchs-anzahl	ATP pmol/Insel	ADP pmol/Insel	ATP/ADP-Verhältnis
Kontrolle	ohne Substrat	ohne Substrat	9	$7,5 \pm 0,8$	$3,2 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,1$
Test	ohne Substrat	Glucose 30 mM	9	$9,8 \pm 0,9^{\ddagger}$	$2,6 \pm 0,3^*$	$3,9 \pm 0,2^{\ddagger}$
Kontrolle	ohne Substrat	ohne Substrat	9	$8,1 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,1$
Test	ohne Substrat	KIC 10 mM	9	$9,0 \pm 0,4^*$	$2,4 \pm 0,2^{\ddagger}$	$3,9 \pm 0,2^{\ddagger}$

Tabelle 4.3 Wirkung von Glucose und KIC auf den Gehalt von ATP und ADP in Maus-Pankreasinseln. Es wurden Paarversuche durchgeführt, in denen beide Proben für 60 Minuten mit reinem Basismedium inkubiert wurden. Auf diese Vorinkubation folgte eine 40-minütige Hauptinkubation mit reinem Basismedium (Kontrolle) oder mit Basismedium unter Zusatz von 30 mM Glucose oder 10 mM KIC (Test). In der Tabelle angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus 9 unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung der Tests gegenüber der Kontrolle erfolgte mit dem zweiseitigen Test für Paardifferenzen von Wilcoxon.

* $p < 0,05$; $\ddagger p < 0,01$

Bei vollständig geschlossenen K_{ATP} -Kanälen konnte 30 mM Glucose die Insulinsekretion im Vergleich zu Kontrollversuchen nicht weiter steigern. KIC dagegen führte unter diesen Bedingungen zu einer starken Zunahme der Insulinsekretion (Abb. 4.13).

Ob sich dieser Unterschied auf eine unterschiedliche ATP-Produktion zurückführen lässt, wurde durch Messung des ATP- und ADP-Gehaltes in den Inseln getestet. Bei diesen Versuchen wurde dem Basismedium 2,7 μ M Glipizid zugesetzt (Tabelle 4.4).

Sowohl 30 mM Glucose als auch 10 mM KIC steigerten den ATP-Gehalt signifikant, während sie den ADP-Gehalt nicht signifikant senkten. Das ATP/ADP-Verhältnis wurde durch beide Nährstoffe signifikant erhöht. Die entsprechenden Änderungen (Test minus Kontrolle) für Glucose und KIC waren allerdings nicht verschieden ($p > 0,05$).

	Vor- inkubation	Haupt- inkubation	Versuchs- anzahl	ATP pmol/Insel	ADP pmol/Insel	ATP/ADP- Verhältnis
Kontrolle	Glipizid 2,7 μ M	Glipizid 2,7 μ M	11	8,3 \pm 0,5	3,6 \pm 0,3	2,4 \pm 0,1
Test	Glipizid 2,7 μ M	Glipizid 2,7 μ M + Glucose 30 mM	11	9,7 \pm 0,6 *	3,5 \pm 0,2	2,8 \pm 0,1 ‡
Kontrolle	Glipizid 2,7 μ M	Glipizid 2,7 μ M	11	8,1 \pm 0,5	3,4 \pm 0,3	2,5 \pm 0,2
Test	Glipizid 2,7 μ M	Glipizid 2,7 μ M + KIC 10 mM	11	9,4 \pm 0,7 ‡	3,4 \pm 0,3	2,9 \pm 0,2 ‡

Tabelle 4.4 *Wirkung von Glucose und KIC auf den Gehalt von ATP und ADP in Maus-Pankreasinseln sowie das Verhältnis von ATP zu ADP bei Anwesenheit von Glipizid. Es wurden Paarversuche durchgeführt, in denen beide Proben für 60 Minuten mit 2,7 μ M Glipizid inkubiert wurden. Auf diese Vorinkubation folgte eine 40-minütige Hauptinkubation mit ebenfalls 2,7 μ M Glipizid (Kontrolle) oder mit 2,7 μ M Glipizid + 30 mM Glucose oder + 10 mM KIC (Test). In der Tabelle angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus 11 unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung der Tests gegenüber der Kontrolle erfolgte mit dem zweiseitigen Test für Paardifferenzen von Wilcoxon.*

* $p < 0,05$; ‡ $p < 0,01$

5 DISKUSSION

5.1 Direkte Wirkungen der α -Ketomonocarbonsäuren auf die K_{ATP} -Kanäle der β -Zelle und andere Strukturen der Maus-Pankreasinsel

5.1.1 Direkte Hemmung der K_{ATP} -Kanäle der β -Zelle

α -Ketoisocaprinsäure und einige verwandte α -Ketomonocarbonsäuren sind Nährstoffe für die β -Zelle des Pankreas. Ihr Metabolismus führt letztendlich zur Bildung von ATP, das die K_{ATP} -Kanäle der β -Zelle schließt. Neben dieser indirekten Hemmung können α -Ketomonocarbonsäuren die K_{ATP} -Kanäle der β -Zelle auch direkt hemmen (BRÄNSTRÖM et al., 1998; SCHMELING, 2004). Die Bindungsstelle für α -Ketomonocarbonsäuren ist ebenso wie die für Sulfonylharnstoffe auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisiert (SCHWANSTEDT et al., 1994; ASHFIELD et al., 1999). Daher wird das Ausmaß der direkten Hemmung der K_{ATP} -Kanäle durch die cytosolische Konzentration der Substanzen bestimmt. Nach Passage der Plasmamembran werden die α -Ketomonocarbonsäuren teilweise zu ihren entsprechenden Aminosäuren transaminiert. Durch die Transaminierung und den Efflux der gebildeten Aminosäuren aus der Zelle verringert sich die cytosolische Konzentration der α -Ketomonocarbonsäuren. In Pankreasinseln der Ratte, die für 30 Minuten mit 10 mM KIC inkubiert wurden, wurde im intrazellulären Wasserraum eine Konzentration von etwa 2 mM KIC gemessen (HUTTON et al., 1979). Unter der Annahme, dass die getesteten α -Ketomonocarbonsäuren auf Cytosol und Mitochondrien beschränkt sind (DEAN, 1973), würde eine 2 mM-Konzentration im intrazellulären Wasser einer 3 bis 4 mM-Konzentration im Cytosol und den Mitochondrien entsprechen. Patch clamp Untersuchungen sprechen dafür, dass 3 bis 4 mM KIV oder KV keine und 3 bis 4 mM KIC oder KC nur eine schwache ($< 10\%$) direkte Hemmung der K_{ATP} -Kanäle bewirken (SCHMELING, 2004; HEISSIG et al., 2005). Dagegen würde PP (3 bis 4 mM) eine starke ($\sim 70\%$) Hemmung auf die K_{ATP} -Kanäle ausüben (SCHMELING, 2004; HEISSIG et al., 2005).

Für eine genaue Aussage über das Ausmaß des direkten Hemmeffektes auf die K_{ATP} -Kanäle der β -Zelle und die Bedeutung dieser Hemmung für die Sekretionssteigerung durch eine bestimmte extrazelluläre Konzentration der α -Ketomonocarbonsäure ist allerdings die Kenntnis ihrer genauen intrazellulären Konzentration notwendig. Solche Daten liegen für Maus- β -Zellen nicht vor. Um auch ohne diese Daten den Anteil der direkten K_{ATP} -Kanalhemmung am sekretionssteigernden Effekt der α -Ketomonocarbonsäuren abzuschätzen, wurde Meglitinid als Vergleichssubstanz eingesetzt. Meglitinid ist ein Sulfonylharnstoff-Analogen (MEYER et al., 1999), das die Insulinsekretion ausschließlich über die Blockade der K_{ATP} -Kanäle der β -Zelle steigert. Zusätzliche Effekte auf die Exocytose-Maschinerie, wie sie Sulfonylharnstoffe, z. B. Glipizid, haben, übt Meglitinid wahrscheinlich nicht aus (ELIASSON et al., 1996; FUHLENDORFF et al., 1998). Auch die untersuchten α -Ketomonocarbonsäuren kön-

nen strukturell als Meglitinid-Analoga aufgefasst werden (MEYER et al., 1999).

Unter Berücksichtigung der Eiweißbindung im Versuchsmedium, das 2 mg/ml Albumin enthielt, entspricht eine in den Perifusionsversuchen eingesetzte Gesamtkonzentration von 100 μM Meglitinid einer freien Konzentration (etwa 60 μM), die in patch clamp Versuchen zu einer kompletten Hemmung der K_{ATP} -Kanäle der β -Zelle führte (ZÜNKLER et al., 1988; PANTEN et al., 1989; SCHWANSTECHEER et al., 1994). In Perifusionsversuchen bei Abwesenheit jeglichen Substrates oder eines anderen Stimulators steigerte 100 μM Meglitinid die Insulinsekretion nur sehr schwach (Abb. 4.4). Die vollständige Hemmung der K_{ATP} -Kanäle allein führt also bei Abwesenheit eines anderen Stimulators nur zu einer sehr schwachen Steigerung der Insulinsekretion. Sie ist deutlich geringer als die Sekretionssteigerung durch die Mehrzahl der untersuchten α -Ketomonocarbonsäuren.

Bei Anwesenheit von Glucose in stimulatorischer Konzentration werden die K_{ATP} -Kanäle bereits durch das beim Glucoseabbau gebildete ATP teilweise geschlossen. Daneben sorgen verstärkende Effekte aus dem Glucose-Metabolismus für eine weitere Stimulation der Insulinsekretion. Wenn dann die K_{ATP} -Kanäle außer durch Glucose noch zusätzlich durch Meglitinid gehemmt wurden, so stieg die Insulinsekretion weiter an (Abb. 4.6). In diesen Versuchen wurden 0,5 μM -, 2,5 μM - und 15 μM -Konzentrationen von Meglitinid eingesetzt. Die entsprechenden freien Konzentration (etwa 0,15 μM , 0,88 μM bzw. 7 μM) führten in patch clamp Untersuchungen zu einer Blockade von 20 %, 50 % bzw. > 90 % der K_{ATP} -Kanäle (ZÜNKLER et al., 1988; PANTEN et al., 1989; SCHMELING, 2004).

Die Insulinsekretion wurde bei Anwesenheit von 10 mM Glucose durch 0,5 μM Meglitinid nicht gesteigert. Bei Anwesenheit von 17 mM Glucose verursachte 0,5 μM Meglitinid nur eine sehr geringe Steigerung. Diese Beobachtungen zeigen, dass eine zusätzliche Hemmung der K_{ATP} -Kanäle um 20 % nicht ausreicht, um die Insulinsekretion deutlich zu steigern.

KIC, KC, KIV und KV konnten die K_{ATP} -Kanäle nicht einmal um 20 % direkt hemmen. Daher spielt für diese α -Ketomonocarbonsäuren (in Konzentrationen bis zu 10 mM) eine direkte K_{ATP} -Kanalhemmung wahrscheinlich keine größere Rolle bei der Stimulation der Insulinsekretion.

PP (3 bis 4 mM im Cytosol) dagegen führte zu einer starken Hemmung der K_{ATP} -Kanäle um etwa 70 % (SCHMELING, 2004). Diese starke direkte Hemmung der K_{ATP} -Kanäle ist wahrscheinlich an der Sekretionssteigerung durch PP beteiligt, wie der Vergleich mit Meglitinid zeigt. Eine Hemmung der K_{ATP} -Kanäle um 50 % wurde in patch clamp Untersuchungen durch etwa 0,88 μM Meglitinid erreicht (siehe oben). Die entsprechende Gesamtkonzentration von 2,5 μM Meglitinid steigerte die Insulinsekretion bei Anwesenheit von 10 mM Glucose kurzzeitig auf 400 % und anschließend dauerhaft auf 200 %. Bei Anwesenheit von 17 mM Glucose wurde die Sekretion ebenfalls dauerhaft auf 200 % gesteigert, jedoch entfiel der initiale Anstieg (Abb. 4.6). Eine Hemmung der K_{ATP} -Kanäle um 50 % reicht somit aus, um die Insulinsekretion zu stimulieren. Die starke direkte Hemmung der K_{ATP} -Kanäle durch PP kann dessen sekretionssteigernde Fähigkeit allerdings allein nicht erklären. Bei Anwesenheit von 10 mM Glucose steigerte PP die Insulinsekretion zunächst auf 1250 % (Abb. 4.5), während

15 μM Meglitinid, dessen entsprechende freie Konzentration (etwa 7 μM) die K_{ATP} -Kanäle um $> 90\%$ hemmt, die Insulinsekretion nur auf etwa 900 % steigerte (Abb. 4.6). An der Stimulation der Insulinsekretion durch PP scheinen also sowohl ein direkter Hemmeffekt auf die K_{ATP} -Kanäle als auch weitere metabolische Effekte (MALAISSE et al., 1983; LENZEN et al., 1984) beteiligt zu sein.

Einschränkend zur Interpretation der Versuche mit Meglitinid muss jedoch gesagt werden, dass unbekannt ist, welche genauen cytosolischen freien Meglitinid-Konzentrationen bei extrazellulärer Applikation von 0,5 μM , 2,5 μM und 15 μM vorliegen.

5.1.2 Beteiligung anderer Kalium-Kanäle der β -Zelle

Neben den ATP-abhängigen Kalium-Kanälen gibt es in der β -Zelle des Pankreas auch spannungsabhängige sowie calcium- und spannungsabhängige Kalium-Kanäle (ASHCROFT und RORSMAN, 1989). Im Gegensatz zum direkten Effekt von KIC auf die K_{ATP} -Kanäle, wurde kein direkter Effekt auf die calciumabhängigen Kalium-Kanäle gefunden (BRÄNSTRÖM et al., 1998). Die beiden nicht-ATP-abhängigen Kalium-Kanaltypen können durch Tetraethylammoniumchlorid (TEA) gehemmt werden. Bei nahezu vollständiger Blockade dieser Kanäle durch TEA (ASHCROFT und RORSMAN, 1989; ROE et al., 1996; SU et al., 2001; MACDONALD et al., 2003) sinkt die Glipizid-induzierte Insulinsekretion (Abb. 4.7). KIC kann jedoch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glipizid und TEA die Insulinsekretion in ähnlichem Ausmaß steigern wie bei Glipizid allein (Abb. 4.8).

Eine Wirkung auf die spannungsabhängigen sowie calcium- und spannungsabhängigen Kalium-Kanäle ist daher nicht für die starke sekretionssteigernde Wirkung von KIC verantwortlich.

5.1.3 Einfluss auf die Exocytose des Insulins

An der Stimulation der Insulinsekretion durch Sulfonylharnstoffe, z. B. Glipizid, ist auch ein direkter Effekt auf die Exocytose beteiligt (ELIASSON et al., 1996). Dieser Effekt ist jedoch bereits bei einer Konzentration von 1 μM Glipizid maximal. Er spielt daher bei Perfusionen mit 2,7 μM Glipizid (freie Konzentration 1,6 μM ; PANTEN et al., 1989) für die weitere Sekretionssteigerung durch α -Ketomonocarbonsäuren keine Rolle mehr. Ferner sind die α -Ketomonocarbonsäuren strukturell und funktionell Analoga des Meglitinids, das selber keinen direkten Effekt auf die Exocytose hat (FUHLENDORFF et al., 1998; HEISSIG et al., 2005).

5.1.4 Einfluss auf die Glucagon-Freisetzung

Glucagon zählt zu den Potentiatoren der Insulinsekretion, d. h. es kann bei Anwesenheit eines anderen Stimulators, z. B. Glipizid, die Insulinsekretion steigern (PANTEN, 1987). Bei Anwesenheit von 1 µg/ml exogenem Glucagon müsste dieser Effekt jedoch bereits soweit ausgereizt sein, dass eine zusätzliche Freisetzung von Glucagon, z. B. durch KIC, keine deutliche Erhöhung der Insulinsekretion mehr vermitteln könnte. In meinen Perifusionsversuchen fiel die relative Sekretionsantwort auf KIC bei Anwesenheit von Glucagon neben Glipizid zwar geringer aus als bei Abwesenheit von Glucagon, war aber immer noch sehr stark (Abb. 4.12). Die starke Stimulation der Insulinsekretion durch KIC beruht somit wahrscheinlich nicht auf einer verstärkten Freisetzung von Glucagon, sondern ist auf andere Effekte zurückzuführen.

5.2 Verstärkende Effekte der α -Ketomonocarbonsäuren auf die Insulinsekretion

Wie in Kapitel 5.1 beschrieben sind die K_{ATP} -Kanäle der β -Zelle im Gegensatz zu anderen Strukturen der Maus-Pankreasinseln von zentraler Bedeutung für die Stimulation der Insulinsekretion durch α -Ketomonocarbonsäuren. Neben der oben erwähnten direkten und indirekten Hemmung der K_{ATP} -Kanäle sind noch weitere verstärkende Mechanismen für die sekretionssteigernde Wirkung der α -Ketomonocarbonsäuren verantwortlich. Diese verstärkenden Mechanismen sind unabhängig von den K_{ATP} -Kanälen und stammen aus dem Stoffwechsel der α -Ketomonocarbonsäuren (HENQUIN, 2000). Um diese K_{ATP} -Kanal-unabhängigen, metabolischen Effekte getrennt von den Effekten auf die K_{ATP} -Kanäle zu untersuchen, müssen die K_{ATP} -Kanäle inaktiviert werden. Dies erfolgte in meinen Versuchen durch den Einsatz des Sulfonylharnstoffs Glipizid in einer maximal wirksamen Konzentration. Dadurch wurden die K_{ATP} -Kanäle der β -Zelle vollständig geschlossen. Die maximale Wirksamkeit dieser Konzentration konnte durch Versuche bestätigt werden, in denen eine Erhöhung der Glipizid-Konzentration von 2,7 µM auf 20 µM zu keiner weiteren Steigerung der Insulinsekretion führte (HASTEDT, 2003). Daneben entspricht in dem hier eingesetzten Versuchsmedium mit 2 mg/ml Albumin die eingesetzte Konzentration von 2,7 µM Glipizid unter Berücksichtigung der Eiweißbindung einer freien Konzentration von 1,6 µM Glipizid (PANTEN et al., 1989). In patch clamp Versuchen konnte bei Anwesenheit von 2 mg/ml Albumin schon durch eine Gesamtkonzentration von 0,1 µM Glipizid eine vollständige Hemmung der K_{ATP} -Kanäle erzielt werden (ZÜNKLER et al., 1988).

Bei Anwesenheit von Glipizid und Abwesenheit von Glucose stieg die Fähigkeit der einzelnen Testsubstanzen zur Stimulation der Insulinsekretion in folgender Reihenfolge an: β -Phenylpyruvat (PP) < α -Ketoisovaleriansäure (KIV) < α -Ketovaleriansäure (KV) \approx α -Ketocaprinsäure (KC) < α -Ketoisocaprinsäure (KIC).

Diese Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen lassen sich mit Unterschieden in

ihrem Metabolismus erklären. Entscheidende Kriterien dafür sind die Fähigkeit zur Bildung von α -Ketoglutarat und Acetyl-CoA sowie die damit verbundene Aktivitätssteigerung des Citratcyclus und die Ausschleusung von Cyclus-Intermediaten, z. B. Citrat.

5.2.1 Transaminierung und Bildung von α -Ketoglutarat

Nach Aufnahme in die β -Zelle werden die α -Ketomonocarbonsäuren teilweise zu ihren entsprechenden Aminosäuren transaminiert. Bei diesen Transaminierungsreaktionen wird eine α -Ketosäure zu ihrer entsprechenden Aminosäure aminiert und gleichzeitig in gekoppelter Reaktion Glutamat zu α -Ketoglutarat desaminiert. Letzteres kann in den Citratcyclus eingeschleust werden und dessen Aktivität steigern (Abb. 5.1). Bei Anwesenheit des Transaminasen-Hemmstoffs Aminooxyessigsäure (AOA) verstärkten α -Ketomonocarbonsäuren die Glipizid-induzierte Insulinsekretion nur sehr wenig (Abb. 4.10). Die Transaminierungsreaktionen scheinen also für den verstärkenden Effekt der α -Ketomonocarbonsäuren von entscheidender Bedeutung zu sein.

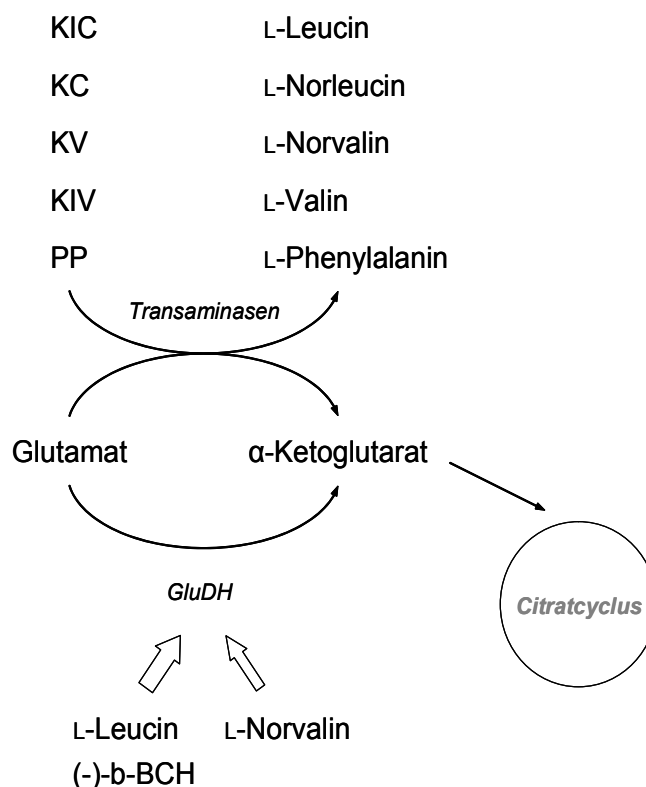


Abb. 5.1 α -Ketomonocarbonsäure-induzierte Produktion von α -Ketoglutarat. Durch Transaminasen werden die α -Ketomonocarbonsäuren in ihre entsprechenden Aminosäuren umgewandelt. Dabei wird gleichzeitig Glutamat zu α -Ketoglutarat umgewandelt, das in den Citratcyclus eingeschleust werden kann und so dessen Aktivität steigert. Die Umwandlung von Glutamat zu α -Ketoglutarat kann auch durch das Enzym Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) katalysiert werden. Dieses Enzym wird allosterisch durch L-Leucin und dessen nicht-metabolisierbares Analogon (-)-b-BCH stark und durch L-Norvalin mäßig aktiviert (SENER und MALAISSE, 1980; PANTEN und LANGER, 1981; LENZEN et al., 1986). Dargestellt sind die Reaktionsrichtungen für α -Ketomonocarbonsäuren und Glutamat als Ausgangsprodukte.

Die in meiner Arbeit verwendeten α -Ketomonocarbonsäuren werden alle in ähnlichem Ausmaß transaminiert. Sie sollten daher alle ähnliche Mengen α -Ketoglutarat bereitstellen (MALAISSE et al., 1981; LENZEN et al., 1985; LENZEN et al., 1986). Offenbar gibt es aber große Unterschiede in der Gesamtproduktion von α -Ketoglutarat durch diese α -Ketomonocarbonsäuren. Neben der Transaminierung gibt es eine zweite Reaktion, in der α -Ketoglutarat aus Glutamat gebildet werden kann: die oxidative Desaminierung. Diese Reaktion wird durch das Enzym Glutamat-Dehydrogenase katalysiert. Die bei der Transaminierung aus den α -Ketomonocarbonsäuren entstehenden Aminosäuren aktivieren die Glutamat-Dehydrogenase in sehr unterschiedlichem Ausmaß (SENER und MALAISSE, 1980; PANTEN und LANGER, 1981; LENZEN et al., 1986). Die weitaus stärkste Aktivierung erfolgt durch L-Leucin, dem Transaminierungsprodukt von KIC. Wesentlich geringer ist die aktivierende Wirkung von L-Norvalin, dem Transaminierungsprodukt von KV. Die Aminosäuren L-Norleucin, L-Valin und L-Phenylalanin, die Transaminierungsprodukte von KC, KIV und PP, aktivieren die Glutamat-Dehydrogenase praktisch nicht. Daher kann eine Leucin-induzierte Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase und Produktion von α -Ketoglutarat erklären, warum KIC die Insulinsekretion viel mehr verstärkt als die anderen α -Ketomonocarbonsäuren.

Für eine starke Beteiligung von α -Ketoglutarat an der Steigerung der K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion sprechen weitere Versuche mit L-Leucin und BCH. L-Leucin steigert ebenfalls die Insulinsekretion (PANTEN et al., 1972), führt aber zu keiner direkten Hemmung der K_{ATP} -Kanäle (BRÄNSTRÖM et al., 1998). Der Abbau von L-Leucin scheint nicht die Hauptursache für seine sekretionssteigernde Wirkung zu sein, denn sein nicht-metabolisierbares Analogon (-)-b-BCH steigert ebenfalls die Insulinsekretion, sowohl in β -Zellen mit intakten K_{ATP} -Kanälen (PANTEN und CHRISTIANS, 1973) als auch in β -Zellen mit vollständig blockierten K_{ATP} -Kanälen (Abb. 4.14). (-)-b-BCH aktiviert die Glutamat-Dehydrogenase ähnlich stark wie L-Leucin.

5.2.2 Abbau der α -Ketomonocarbonsäuren und Bildung von Acetyl-CoA

Neben der Transaminierung und Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase ist der intramitochondriale Abbau der α -Ketomonocarbonsäuren eine weitere Möglichkeit zur Bereitstellung von metabolischen Signalen zur Verstärkung der Insulinsekretion (Abb. 5.2). α -Ketomonocarbonsäuren werden mit Hilfe eines Transporters in das Mitochondrium transportiert (HUTSON und RANNELS, 1985; HUTSON et al., 1990). Dort beginnt ihr Abbau mit der oxidativen Decarboxylierung zu den entsprechenden CoA-Estern. Dieser für den Abbau geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird katalysiert durch die Verzweigketten-Ketosäuren-Dehydrogenase (branched-chain keto acid dehydrogenase, BCKADH).

Das aus Phenylpyruvat gebildete Phenylacetyl-CoA kann in Pankreasinseln nicht weiter abgebaut werden (PANTEN und LANGER, 1981; MALAISSE et al., 1983). Die direkte Energieausbeute aus dem spezifischen Abbau von PP ist somit sehr gering.

Der spezifische Abbau von KIV endet mit der Bildung von Succinyl-CoA, das in den Citratcyclus eingeschleust werden kann. Es aktiviert den Citratcyclus jedoch nicht so stark wie α -Ketoglutarat (vgl. 5.2.3), weil in Maus- β -Zellen Succinyl-CoA aufgrund der geringen Aktivität an Malat-Enzym (MACDONALD, 2002) zwar Oxalacetat, aber nicht Acetyl-CoA liefern kann. Für die Bildung von Citrat wird daher Acetyl-CoA aus anderen endogenen Prozessen benötigt (FAHIEN und MACDONALD, 2002; MACDONALD et al., 2005). Die Energieausbeute durch eingeschleustes Succinyl-CoA ist somit gering. In Herz- und Leberzellen wurde außerdem ein Efflux eines Zwischenprodukts (β -Hydroxyisobutyrat) des Abbaus von KIV aus den Zellen beschrieben (CORKEY et al., 1982; LETTO et al., 1990). Sollte dies in den β -Zellen des Pankreas ebenfalls der Fall sein, so würde die Produktion von Succinyl-CoA geringer ausfallen, als aus dem direkten Abbau zu erwarten wäre.

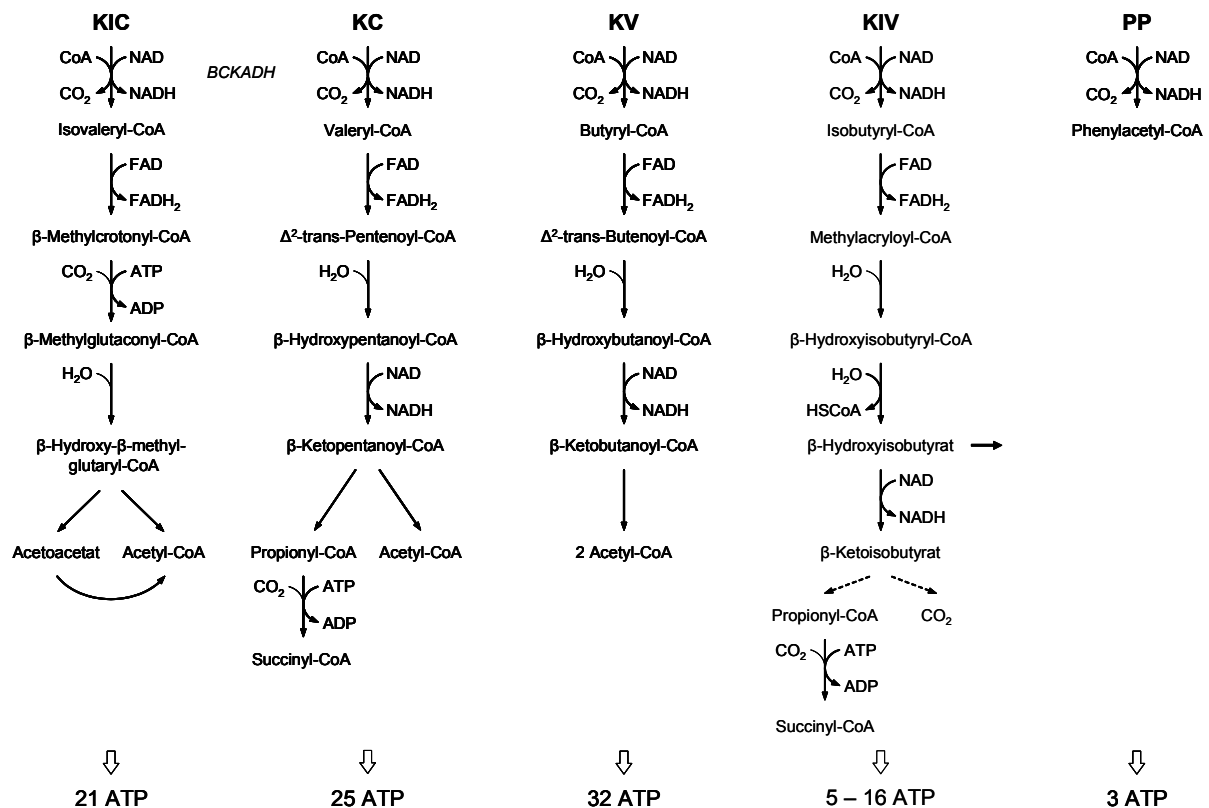


Abb. 5.2 Abbau der α -Ketomonocarbonsäuren und Bereitstellung von ATP. Der Abbau der α -Ketomonocarbonsäuren beginnt mit der oxidativen Decarboxylierung, katalysiert durch die Verzweigketten-Ketosäuren-Dehydrogenase (BCKADH). Durch weitere Abbauprozesse entstehen aus KIC, KC, KV und KIV Acetyl-CoA und/oder Succinyl-CoA, die in den Citratcyclus eingeschleust und letztendlich zur Bildung von ATP verwendet werden können (PANTEN, 1975; HUTTON et al., 1979). Nur das aus PP entstehende Phenylacetyl-CoA kann nicht weiter abgebaut werden (PANTEN und LANGER, 1981; MALAISSE et al., 1983). Eine Erklärung der Varianz der ATP-Bildung durch KIV erfolgt im Text.

Beim spezifischen Abbau von KC entsteht neben Succinyl-CoA auch Acetyl-CoA. Dieses dient dem Citratcyclus als Substrat und steigert die Citrat-Produktion und dadurch letztendlich die Produktion von Reduktionsäquivalenten für die Atmungskette. Daneben ist die Citrat-Produktion aber auch Ausgang für weitere Reaktionen, z. B. für die Fettsäuresynthese (LÖFFLER, 1997c).

Der Abbau von KV stellt ebenfalls größere Mengen Acetyl-CoA bereit.

Das beim Abbau von KIC entstehende Acetoacetat kann zu ~ 20 % in Acetyl-CoA umgewandelt werden (PANTEN und KLEIN, 1982).

Die α -Ketomonocarbonsäuren unterscheiden sich also in der Fähigkeit Acetyl-CoA bereitzustellen. Diejenigen α -Ketomonocarbonsäuren, die Acetyl-CoA produzieren (KIC, KC, KV), lösen eine stärkere und länger dauernde Insulinsekretion aus als die α -Ketomonocarbonsäuren, deren Abbau kein Acetyl-CoA bereitstellt (KIV, PP).

Diese Korrelation zwischen Produktion von Acetyl-CoA aus dem spezifischen Abbau der α -Ketomonocarbonsäuren und Intensität der Verstärker-Wirkung auf die Insulinsekretion deutet auf eine Beteiligung von Acetyl-CoA an den verstärkenden Mechanismen hin.

5.2.3 Bedeutung des Citratcyclus

Acetyl-CoA ist ein Hauptsubstrat für den Citratcyclus (LÖFFLER, 1997c). Innerhalb eines Durchlaufes durch den Cyclus wird es vollständig zu CO₂ abgebaut und liefert dabei Reduktionsäquivalente und GTP. Oxalacetat, das als Akzeptor für Acetyl-CoA fungiert, wird innerhalb eines Cyclus wieder regeneriert. Bei einem verstärkten Angebot an Acetyl-CoA steigt die Aktivität des Citratcyclus und damit auch die Energieausbeute. Daneben können Cyclus-Intermediate ausgeschleust und für weitere Stoffwechselprozesse verwendet werden (Katarose).

Durch die Reaktion von Acetyl-CoA mit Oxalacetat entsteht Citrat (Abb. 5.3). Dieses kann das Mitochondrium verlassen. Im Cytosol wird es durch die Citratlyase wieder in Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten. Aus Acetyl-CoA entsteht dann Malonyl-CoA, das als Ausgangsprodukt der Fettsäuresynthese dient. Andererseits entsteht Acetyl-CoA auch bei der β -Oxidation der Fettsäuren, die intramitochondrial lokalisiert ist. Da Acyl-CoA-Ester die innere Mitochondrienmembran nicht unmittelbar überwinden können, werden sie durch Kopplung an Carnitin in eine Transportform umgewandelt. Diese Reaktion wird durch die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT 1) katalysiert. Malonyl-CoA hemmt die CPT 1, sodass die Acyl-CoA-Ester nicht mehr in das Mitochondrium transportiert und daher auch nicht abgebaut werden können. Es kommt somit zu einem Anstau von Acyl-CoA-Estern im Cytosol, denen eine Bedeutung für die Stimulation der Insulinsekretion zugesprochen wird (WARNOTTE et al., 1994; CORKEY et al., 2000; STRAUB und SHARP, 2002; YANEY und CORKEY, 2003; RODUIT et al., 2004; MACDONALD et al., 2005).

Neben Citrat können auch Succinat, Fumarat und Malat das Mitochondrium verlassen und für cytosolische Stoffwechselreaktionen zur Verfügung stehen (Abb. 5.3). Im Cytosol kann Malat zu Pyruvat umgewandelt werden (LÖFFLER, 1997c). Diese Reaktion wird durch das Malat-Enzym katalysiert. Pyruvat kann anschließend wieder in das Mitochondrium aufgenommen werden und Oxalacetat (katalysiert durch die Pyruvat-Carboxylase, PC) sowie Acetyl-CoA (katalysiert durch die Pyruvat-Dehydrogenase, PDH) bereitstellen. Citrat kann also in Zellen mit Malat-Enzym, z. B. β -Zellen der Ratte, aus Malat über Pyruvat als Zwischenstufe gebildet werden.

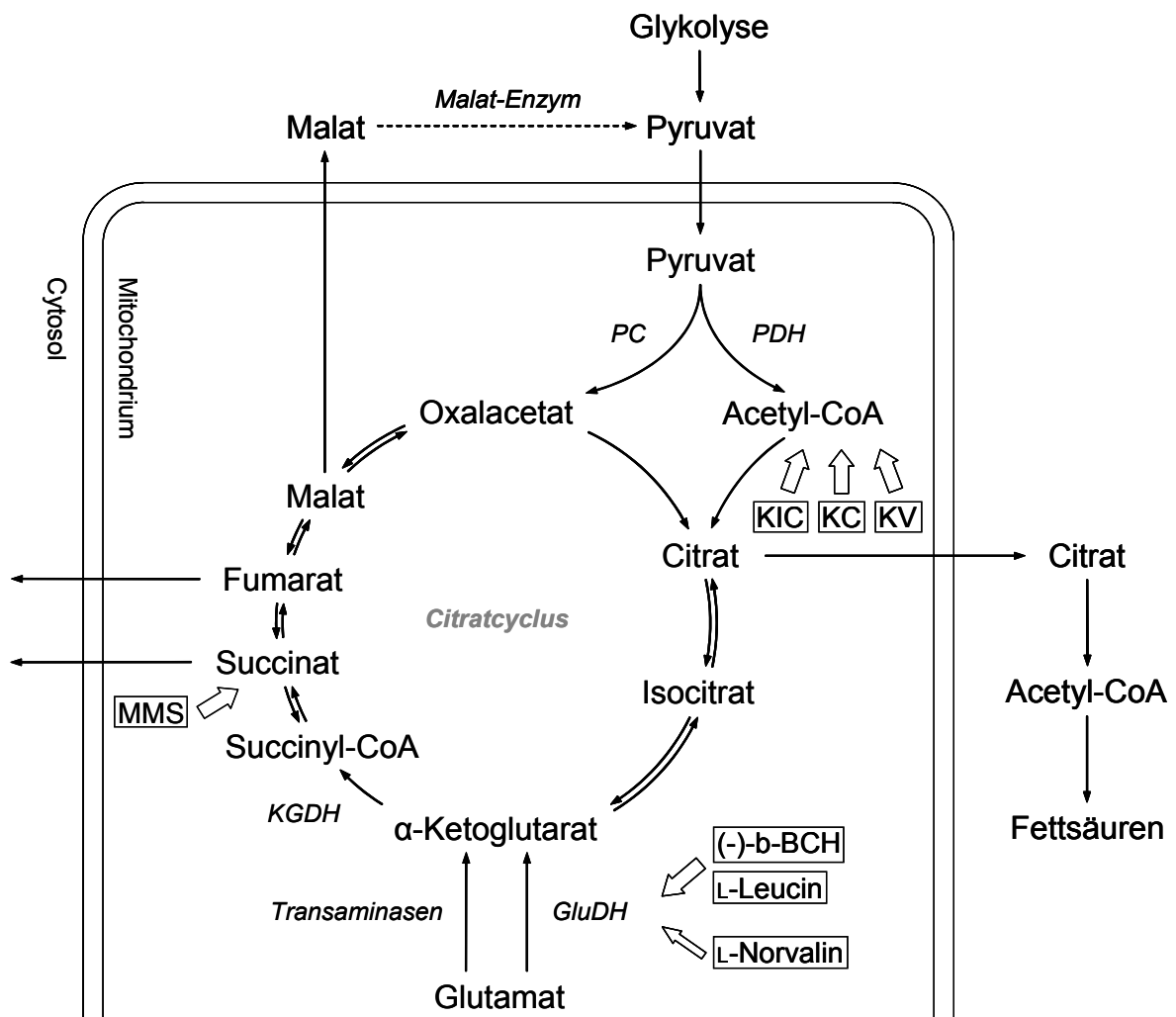


Abb. 5.3 Interaktion der α -Ketomonocarbonsäuren mit dem Citratzyklus. Der Abbau von KIC, KC und KV stellt größere Mengen Acetyl-CoA bereit. (-)-b-BCH, L-Leucin und L-Norvalin aktivieren die Glutamat-Dehydrogenase und fördern so die Bildung von α -Ketoglutarat. Dabei sind (-)-b-BCH und L-Leucin wesentlich stärker wirksam als L-Norvalin (SENER und MALAISSE, 1980; PANTEN und LANGER, 1981; LENZEN et al., 1986). MMS stellt nach Esterhydrolyse Succinat bereit. Succinat, Fumarat, Malat und Citrat können das Mitochondrium verlassen und für weitere Stoffwechselreaktionen zur Verfügung stehen (LÖFFLER, 1997c). In β -Zellen der Maus ist die Enzymaktivität an Malat-Enzym sehr gering (MACDONALD, 2002), sodass die Umwandlung von Malat zu Pyruvat kaum erfolgen kann. PC: Pyruvat-Carboxylase, PDH: Pyruvat-Dehydrogenase, KGDH: Ketoglutarat-Dehydrogenase, GluDH: Glutamat-Dehydrogenase

Die Aktivität dieses Enzyms ist in Maus- β -Zellen jedoch sehr gering (MACDONALD, 2002). Die Umwandlung von Malat zu Pyruvat und anschließende Bildung von Oxalacetat und Acetyl-CoA spielt also bei der Stimulation der Insulinsekretion von Maus-Pankreasinseln keine Rolle. In β -Zellen der Maus kann Malat nur im Rahmen des Citratcyclus zu Oxalacetat umgewandelt werden. Für die anschließende Bildung von Citrat ist die Zufuhr von Acetyl-CoA notwendig, das durch andere endogene Prozesse bereitgestellt wird.

Ein wichtiges Intermediat des Citratcyclus ist α -Ketoglutarat. Es kann über verschiedene Wege weitere Intermediate des Citratcyclus bilden (LÖFFLER, 1997c). Über Succinyl-CoA, Succinat und Fumarat kann es zur Bildung von Malat und nachfolgend Oxalacetat verwendet werden. Die Reaktion von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA wird durch das Enzym α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH) katalysiert. Diese Reaktion ist neben der Bildung von Citrat aus Oxalacetat die einzige Reaktion des Citratcyclus, die nicht umkehrbar ist (LÖFFLER, 1997c). Wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben steigern die α -Ketomonocarbonsäuren die Bildung von α -Ketoglutarat, das in den Citratcyclus eingeschleust wird (Anaplerose) und dessen Aktivität steigert. Dabei spielt eine direkte Wirkung der α -Ketomonocarbonsäuren auf die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase keine Rolle (vgl. 4.2). α -Ketoglutarat kann auch durch Umkehrung der Isocitrat-Dehydrogenase- und Aconitase-Reaktion Citrat produzieren. Insgesamt erhöht die Bildung von α -Ketoglutarat durch die α -Ketomonocarbonsäuren also die Aktivität des Citratcyclus und führt somit zu einer verstärkten Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten (z. B. NADH) und ATP. Daneben können durch Ausschleusen anderer Cyclus-Intermediate, z. B. Citrat, ins Cytosol weitere Reaktionen verstärkt werden, z. B. die Fettsäuresynthese (MACDONALD et al., 2005).

5.3 Gesamteffekte der α -Ketomonocarbonsäuren auf die Insulinsekretion

Die Fähigkeit der α -Ketomonocarbonsäuren zur Stimulation der Insulinsekretion durch β -Zellen der Maus beruht auf dem Zusammenspiel mehrerer Effekte. Durch direkte oder indirekte (metabolische) Hemmung der K_{ATP} -Kanäle wird die Sekretionssteigerung ausgelöst (vgl. 5.1.1) und durch metabolische Effekte verstärkt (vgl. 5.2).

In Perifusionsversuchen bei Abwesenheit von Glipizid und Glucose, also bei β -Zellen mit aktiven K_{ATP} -Kanälen, stieg die sekretionssteigernde Wirkung der untersuchten α -Ketomonocarbonsäuren in folgender Reihenfolge an: KIV < KV \approx PP < KC < KIC (vgl. 4.1.3).

Der Hauptunterschied im Vergleich zu den Verhältnissen bei vollständig geschlossenen K_{ATP} -Kanälen (vgl. 4.1.1) liegt in der stärkeren Wirkung von PP und der schwächeren Wirkung von KIV.

Bei Abwesenheit von Glipizid und Glucose tragen sowohl die K_{ATP} -Kanal-abhängigen als auch die K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Effekte zur Stimulation der Insulinsekretion bei. Dabei kommen die letzteren (verstärkenden) Effekte erst zum Tragen, wenn die Insulinsekretion

durch Schließen der K_{ATP} -Kanäle ausgelöst wurde (HENQUIN, 2000). Die K_{ATP} -Kanal-abhängigen Effekte (also die Sekretion-auslösenden Effekte) sind direkte Hemmeffekte auf die K_{ATP} -Kanäle oder indirekte Hemmeffekte durch Steigerung der ATP-Produktion durch den Metabolismus. Wie in 5.2.2 angegeben, stellt der Abbau der α -Ketomonocarbonsäuren unterschiedliche Mengen an Reduktionsäquivalenten ($NADH$, $FADH_2$) bereit, die über die Atmungskette zur Bildung von ATP herangezogen werden können. Eine Aktivierung des Citratcyclus, z. B. durch erhöhte Produktion von Acetyl-CoA oder α -Ketoglutarat, steigert ebenfalls die Bildung von Reduktionsäquivalenten und ATP. Diese metabolischen Eigenschaften sind somit nicht nur für die verstärkenden Effekte wichtig, sondern auch für die auslösenden. Die Reihenfolge der Stärke der Sekretionssteigerung durch die α -Ketomonocarbonsäuren bei Maus- β -Zellen mit aktiven K_{ATP} -Kanälen lässt sich durch eine Kombination aus dem direkten Effekt auf die K_{ATP} -Kanäle und aus Effekten durch den Metabolismus der Substanzen erklären.

In Konzentrationen bis zu 10 mM hat KIV keine direkte Wirkung auf die K_{ATP} -Kanäle (SCHMELING, 2004). Daneben stellt sein Metabolismus nur sehr wenig ATP und weitere metabolische Signale bereit (vgl. 5.2), sodass bei Abwesenheit eines anderen Nährstoffes oder Stimulators nur eine sehr schwache, kurzzeitige Stimulation der Insulinsekretion ausgelöst werden kann (Abb. 4.4).

Wie sein verzweigtes Isomer KIV hat KV in Konzentrationen bis zu 10 mM keine direkte Wirkung auf die K_{ATP} -Kanäle (SCHMELING, 2004). Durch seinen Abbau und die stärkere Aktivierung des Citratcyclus stellt es allerdings wesentlich mehr ATP und weitere metabolische Signale bereit (vgl. 5.2). Dem entsprechend ist die sekretionssteigernde Wirkung von KV wesentlich größer als die von KIV (Abb. 4.4).

Die Sekretionsantwort auf KC fiel deutlich stärker aus als die auf KV (Abb. 4.4). Die verstärkenden Effekte beider Substanzen bei Anwesenheit von Glipizid waren jedoch ähnlich ausgeprägt (Abb. 4.1). Die im Vergleich zu KV stärkere stimulierende Wirkung von KC in Maus-Pankreasinseln mit aktiven K_{ATP} -Kanälen lässt sich somit nicht auf starke Unterschiede im Metabolismus zurückführen, sondern könnte möglicherweise auf der zusätzlichen leichten direkten Hemmung der K_{ATP} -Kanäle durch KC (SCHMELING, 2004) beruhen.

Diese leichte direkte K_{ATP} -Kanalhemmung ist wahrscheinlich auch eine Eigenschaft von KIC (SCHMELING, 2004), dessen metabolische Effekte jedoch stärker sind als die seines unverzweigten Isomers KC (vgl. 5.2). Dies spiegelt sich auch in der stärkeren Sekretionsantwort auf KIC im Vergleich zu KC wider (Abb. 4.4).

Die Bereitstellung von α -Ketoglutarat durch die Transaminierung von PP und die daraus resultierende Aktivierung des Citratcyclus (vgl. 5.2) reichen allein wahrscheinlich nicht aus, den starken PP-induzierten initialen Anstieg der Insulinsekretion (Abb. 4.4) zu erklären. Für diesen Effekt von PP ist daher offenbar eine direkte K_{ATP} -Kanalhemmung (SCHMELING, 2004) entscheidend.

5.4 Wirkung von Glucose auf die α -Ketomonocarbonsäure-induzierte Insulinsekretion

Im Vergleich zur α -Ketomonocarbonsäure-induzierten Insulinsekretion bei Abwesenheit eines anderen Nährstoffes (Abb. 4.1 und Abb. 4.4) veränderte die Anwesenheit von 10 mM Glucose die Reihenfolge der Stärke der mittleren Sekretionssteigerung durch die einzelnen α -Ketomonocarbonsäuren (Abb. 4.3 und Abb. 4.5).

Diese Verschiebungen sind offenbar Folge metabolischer Interferenzen zwischen Glucose-Metabolismus einerseits und α -Ketomonocarbonsäure-Metabolismus andererseits. Die Details dieser Interferenzen sind für die β -Zelle jedoch nicht genügend bekannt, um die Auswirkungen auf die Insulinsekretion genau vorhersehen zu können. Daher zeigen diese Glucose-Wirkungen wie wichtig es ist, die β -cytotropen Mechanismen der α -Ketomonocarbonsäuren bei Abwesenheit von anderen Nährstoffen zu untersuchen.

5.5 Selektive Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion bei Anwesenheit des Sulfonylharnstoffs Glipizid

In Perifusionsversuchen mit reinem Basismedium, ohne Glucose und Glipizid, steigerten sowohl Glucose als auch KIC die Insulinsekretion der β -Zellen. Wurden die Inseln vor Zugabe der Testsubstanz dagegen für 60 Minuten ohne Glucose, aber mit Glipizid perifundiert, so war Glucose nicht mehr in der Lage, eine Sekretionssteigerung zu vermitteln (Abb. 4.13). Dieser Verlust der sekretionssteigernden Wirkung trat nur bei Glucose auf. Sowohl KIC als auch BCH und MMS steigerten die Insulinsekretion auch unter diesen Bedingungen (Abb. 4.14).

Bei vollständig geschlossenen K_{ATP} -Kanälen muss der Metabolismus der Testsubstanz ausreichend Signale des verstärkenden Weges bereitstellen, um die Insulinsekretion weiter zu stimulieren. Ein Hauptprodukt des Stoffwechsels ist ATP. Zusätzlich zu seiner Hemmwirkung auf die K_{ATP} -Kanäle wird für ATP auch eine Rolle als Signal der verstärkenden Effekte der Insulinsekretion diskutiert (HENQUIN, 2000).

Nach 60-minütiger Perifusion der Inseln ohne Nährstoff, befinden sich die Zellen in einem Energiemangelzustand. Werden sie durch Anwesenheit von Glipizid zusätzlich zur Insulinsekretion angeregt, so sinkt ihr ATP-Gehalt weiter (DETIMARY et al., 1998; ELMİ et al., 2000). Durch 40-minütige Inkubation mit 30 mM Glucose oder 10 mM KIC stiegen der ATP-Gehalt und das ATP/ADP-Verhältnis von Maus-Pankreasinseln, die zuvor für 60 Minuten mit Glipizid inkubiert worden waren, nur mäßig an. Das Ausmaß dieser Erhöhung war bei beiden Nährstoffen in etwa gleich (Tabelle 4.4). Da jedoch nur KIC und nicht Glucose die Insulinsekretion bei Anwesenheit von Glipizid steigerte, scheint ein Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses wahrscheinlich nicht als Signal des verstärkenden Weges zu wirken (URBAN und PANTEN, 2005).

Wie in Kapitel 5.2 beschrieben, wird KIC in der β -Zelle durch intramitochondrialen Abbau unter Bildung von Acetyl-CoA und Transaminierung mit Glutamat metabolisiert. Bei der Transaminierung entstehen α -Ketoglutarat und L-Leucin. L-Leucin ist ein starker Aktivator der Glutamat-Dehydrogenase und steigert auf diese Weise zusätzlich die α -Ketoglutarat-Produktion (SENER und MALAISSE, 1980; PANTEN und LANGER, 1981; LENZEN et al., 1986). α -Ketoglutarat kann im Citratcyclus über die Zwischenstufen Succinat, Fumarat und Malat zu Oxalacetat umgewandelt werden, das zusammen mit Acetyl-CoA Citrat bildet. Citrat kann aus α -Ketoglutarat auch durch Umkehrung der Isocitrat-Dehydrogenase- und Aconitase-Reaktionen über die Zwischenstufe Isocitrat gebildet werden (Abb. 5.3). Insgesamt steigert die Bildung von α -Ketoglutarat somit die Aktivität des Citratcyclus und damit verbunden den Export von Cyclus-Intermediaten ins Cytosol (MACDONALD et al., 2005). Welche aus dem Mitochondrium ausgeschleusten Intermediate genau für die Verstärkung der Insulinsekretion durch KIC verantwortlich sind, ist noch unklar.

Der Export von Succinat, Fumarat und Malat scheint wahrscheinlich nicht von Bedeutung zu sein, da Monomethylsuccinat (MMS), das in der β -Zelle durch Esterhydrolyse Succinat bildet, die Insulinsekretion bei Anwesenheit von Glipizid nur sehr schwach stimulierte (Abb. 4.14). Succinat kann im Rahmen des Citratcyclus Fumarat, Malat und Oxalacetat bilden (Abb. 5.3). Für die Bildung von Citrat wird in Maus- β -Zellen allerdings aufgrund der geringen Aktivität an Malat-Enzym (MACDONALD, 2002) Acetyl-CoA aus anderen endogenen Prozessen benötigt. Eine geringe Bildung von Citrat könnte daher mit für die schwache stimulierende Wirkung von MMS verantwortlich sein (URBAN und PANTEN, 2005).

Der Export von Citrat und Isocitrat, das durch die Aconitase-Reaktion aus Citrat gebildet werden kann (Abb. 5.3), scheint für die K_{ATP} -Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion eine wichtige Rolle zu spielen. Diese Annahme wird durch Versuche mit dem Leucin-Analogon BCH gestärkt. BCH stimuliert die Insulinsekretion bei Anwesenheit von Glipizid initial ähnlich stark wie KIC (Abb. 4.14). Dies beruht wahrscheinlich nur auf einer gesteigerten Produktion von α -Ketoglutarat, da BCH nicht metabolisiert wird, aber die Glutamat-Dehydrogenase stark aktiviert (LIU et al., 2003). Innerhalb des Citratcyclus kann α -Ketoglutarat wie oben beschrieben Isocitrat und Citrat bilden und somit deren Export ins Cytosol steigern.

Die Produktion von Citrat und Isocitrat durch den Glucose-Metabolismus setzt die intramitochondriale Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA (durch die Pyruvat-Dehydrogenase) und Oxalacetat (durch die Pyruvat-Carboxylase) voraus. Wird die Pyruvat-Carboxylase, z. B. durch Phenyllessigsäure, gehemmt, so sinkt auch die Glucose-induzierte Insulinsekretion (LIU et al., 2002). Sulfonylharnstoffe haben keinen direkten Hemmeffekt auf die Pyruvat-Carboxylase (WHITE et al., 1988). Die Aktivität der Pyruvat-Carboxylase kann jedoch durch ein verringertes ATP/ADP-Verhältnis und eine niedrige Acetyl-CoA-Konzentration im Mitochondrium gesenkt werden (WHITE et al., 1988; CURI et al., 1991). Eine Hemmung der Pyruvat-Carboxylase könnte erklären, warum Glucose bei Anwesenheit von Glipizid und Abwesenheit eines anderen Nährstoffes die Insulinsekretion nicht steigern konnte (URBAN und PANTEN,

2005). Diese Vorstellung ist im Einklang damit, dass der Export von Citrat und Isocitrat eine wichtige Rolle für den verstärkenden Weg der Insulinsekretion spielt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

6.1 Mechanismus der α -Ketomonocarbonsäure-induzierten Insulinsekretion

Die Nährstoff-induzierte Stimulation der Insulinsekretion durch die β -Zellen des Pankreas verläuft über verschiedene Mechanismen, die sich in zwei Hauptwege einteilen lassen: den auslösenden und den verstärkenden Weg. Der auslösende Weg umfasst die Kaskade: Metabolismus des Nährstoffes, Bildung von ATP, Schließen ATP-abhängiger Kalium-Kanäle (K_{ATP} -Kanäle), Depolarisation der Plasmamembran, Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle, Einstrom von Calcium-Ionen, Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration und Exocytose des Insulins. Sobald die Insulinsekretion auf diesem Weg ausgelöst wurde, kann ihr Ausmaß durch weitere metabolische Signale verstärkt werden. Welche einzelnen Mediatoren an diesem verstärkenden Weg beteiligt sind, ist allerdings noch nicht genau bekannt und sollte in meiner Arbeit näher untersucht werden. Dazu wurden Perifusionsversuche durchgeführt, in denen isolierte Maus-Pankreasinseln mit verschiedenen Testsubstanzen umströmt wurden. Als Testsubstanzen dienten α -Ketomonocarbonsäuren (als Natriumsalz), die die Insulinsekretion in unterschiedlichem Ausmaß stimulieren. Sie unterscheiden sich in ihrer direkten Wirkung auf die K_{ATP} -Kanäle und in einzelnen Punkten ihres Metabolismus.

Durch vollständiges Schließen aller K_{ATP} -Kanäle (durch den Sulfonylharnstoff Glipizid in maximal wirksamer Konzentration) wurde die Insulinsekretion ausgelöst und gleichzeitig eine weitere Aktivierung des auslösenden Weges verhindert. Unter diesen Bedingungen verstärkten α -Ketomonocarbonsäuren die Insulinsekretion in folgender Reihenfolge (Abb. 4.1):

β -Phenylpyruvat (PP) < α -Ketoisovaleriansäure (KIV) < α -Ketovaleriansäure (KV) \approx α -Ketocaprinsäure (KC) < α -Ketoisocaprinsäure (KIC).

Diese Reihenfolge korreliert mit der Fähigkeit der einzelnen α -Ketomonocarbonsäuren zur Aktivierung des Citratcyclus. Dabei spielt eine direkte Wirkung der α -Ketomonocarbonsäuren auf die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase keine Rolle. Die Bildung von Acetyl-CoA (durch den Abbau der Substanzen) und α -Ketoglutarat (aufgrund von Transaminierungsreaktionen und Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase) ist dagegen entscheidend. Die α -Ketomonocarbonsäuren, deren Abbau Acetyl-CoA bereitstellt (KIC, KC, KV), haben eine stärkere sekretionsverstärkende Wirkung als die α -Ketomonocarbonsäuren, deren Abbau kein Acetyl-CoA bereitstellt (KIV, PP). Auch die Fähigkeit zur Bildung von α -Ketoglutarat korreliert mit der sekretionsverstärkenden Wirkung der α -Ketomonocarbonsäuren. Die am stärksten wirksame α -Ketomonocarbonsäure KIC stellt am meisten α -Ketoglutarat bereit, da sein Transaminierungsprodukt L-Leucin die Glutamat-Dehydrogenase stark aktiviert. Eine Hemmung der Transaminierungen mit Aminooxyessigsäure (AOA) schaltet die Verstärker-Wirkung der α -Ketomonocarbonsäuren nahezu vollständig aus (Abb. 4.10).

Eine Erhöhung der Kapazität des Citratcyclus steigert nicht nur die Energieproduktion (durch Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten), sondern führt auch zu einer verstärkten Ausschleusung von Cyclus-Intermediaten ins Cytosol. Sie stehen dort für weitere Signal- und Stoffwechselprozesse zur Verfügung. Ausgeschleustes Citrat kann z. B. für die Bildung von Fettsäuren verwendet werden, die für den verstärkenden Weg der Nährstoff-induzierten Insulinsekretion eine Rolle spielen könnten (CORKEY et al., 2000).

Sind die K_{ATP} -Kanäle der β -Zellen aktiv (in Perfusionen bei Abwesenheit von Glipizid), so ergibt sich eine veränderte sekretionssteigernde Reihenfolge (Abb. 4.4):

α -Ketoisovaleriansäure (KIV) < α -Ketovaleriansäure (KV) \approx β -Phenylpyruvat (PP) < α -Ketocaprönsäure (KC) < α -Ketoisocaprönsäure (KIC).

Unter diesen Bedingungen sind sowohl der auslösenden als auch der verstärkende Weg an der Insulinsekretion beteiligt. Versuche mit Meglitinid (einem Sulfonylharnstoff-Analogon) deuten darauf hin, dass direkte Hemmung der K_{ATP} -Kanäle wahrscheinlich nur für PP einen entscheidenden Beitrag zu dessen stimulatorischer Wirkung leistet. Bei KIC und KC könnte der direkte Effekt in geringem Ausmaß beteiligt sein, während er bei KV und KIV zu vernachlässigen ist. In Kombination mit den metabolischen Effekten des verstärkenden Weges lässt sich die Reihenfolge der stimulatorischen Wirkung der α -Ketomonocarbonsäuren bei Abwesenheit von Glipizid folgendermaßen erklären: Der direkte Hemmeffekt auf die K_{ATP} -Kanäle spielt bei KIV und KV keine Rolle. Der Metabolismus von KV stellt allerdings mehr verstärkende Signale bereit als der von KIV, sodass die Insulinsekretion durch KV stärker und andauernder stimuliert wird als durch sein Isomer KIV. PP führt zu einer starken direkten Hemmung der K_{ATP} -Kanäle. Die Bildung von verstärkenden Signalen für die Insulinsekretion durch den Metabolismus von PP ist allerdings sehr gering. Dies könnte die kurze Dauer der Sekretionssteigerung durch PP erklären. Bei KC und KIC spielen für die Stimulation der Insulinsekretion sowohl eine mäßige direkte Hemmung der K_{ATP} -Kanäle als auch eine Aktivierung des verstärkenden Weges durch ihren Metabolismus eine Rolle. Die stärkere stimulatorische Wirkung von KIC im Vergleich zu KC könnte auf einer stärkeren Bildung von Signalen des verstärkenden Weges beruhen.

6.2 Mechanismus der Nährstoff-induzierten Verstärkung der Insulinsekretion

Der physiologische Hauptstimulus der Insulinsekretion ist Glucose. In Perifusionsversuchen bei Abwesenheit eines anderen Nährstoffes und Anwesenheit von Glipizid, d. h. bei vollständig geschlossenen K_{ATP} -Kanälen, kam es zu einem Verlust der sekretionssteigernden Wirkung von Glucose (Abb. 4.13). KIC, BCH (ein nicht metabolisierbares Leucin-Analogon) und Monomethylsuccinat (MMS) konnten die Insulinsekretion unter diesen Bedingungen jedoch weiterhin steigern (Abb. 4.14). Bei vollständig geschlossenen K_{ATP} -Kanälen muss der Metabolismus des Nährstoffes genügend Signale des verstärkenden Weges bereitstellen, um die

Insulinsekretion weiter stimulieren zu können. Welche Produkte des Metabolismus dabei als Mediatoren des verstärkenden Weges dienen ist noch unklar.

Der für den auslösenden Weg entscheidende Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses durch den Metabolismus des Nährstoffes scheint für den verstärkenden Weg nicht von Bedeutung zu sein. In Maus-Pankreasinseln, die zuvor mit Glipizid inkubiert worden waren, stiegen der ATP-Gehalt und das ATP/ADP-Verhältnis nach Zugabe von Glucose oder KIC in ähnlichem Ausmaß an (Tabelle 4.4). Im Gegensatz zu Glucose konnte KIC die Insulinsekretion jedoch auch bei Anwesenheit von Glipizid stark steigern.

Eine Aktivierung des Citratcyclus durch den Metabolismus des Nährstoffes hat den Export von Cyclus-Intermediaten zur Folge. Von entscheidender Bedeutung für den verstärkenden Weg könnte der Export von Citrat und Isocitrat zu sein. Die Testsubstanzen, die in der Lage sind, den Export von Citrat und Isocitrat zu steigern (KIC, BCH) verstärkten (bei Anwesenheit von Glipizid) die Insulinsekretion besonders intensiv (Abb. 4.14). MMS dagegen kann den Export von Citrat und Isocitrat ins Cytosol kaum steigern. Es verstärkte die Insulinsekretion bei Anwesenheit von Glipizid auch nur sehr schwach (Abb. 4.14). Glucose war bei Abwesenheit eines anderen Nährstoffes, aber nach längerem Einwirken von Glipizid nicht in der Lage, die Insulinsekretion zu verstärken (Abb. 4.13 A). Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass die Pyruvatcarboxylase, die an der Glucose-induzierte Bildung von Citrat beteiligt ist, unter diesen Bedingungen gehemmt wird.

Insgesamt scheinen die Bildung von Citrat und Isocitrat und ihr Export aus dem Mitochondrium ins Cytosol am verstärkenden Weg der Insulinsekretion beteiligt zu sein.

7 LITERATUR

- AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J (1999): Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev* 20(2): 101-135
- ASHCROFT FM (1988): Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu Rev Neurosci* 11: 97-118
- ASHCROFT FM, RORSMAN P (1989): Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54(2): 87-143
- ASHFIELD R, GRIBBLE F, ASHCROFT SJH, ASHCROFT FM (1999): Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K_{ATP} channel. *Diabetes* 48(6): 1341-1347
- BERS DM (1982): A simple method for the accurate determination of free [Ca] in Ca-EGTA solutions. *Am J Physiol* 242(5): C404-408
- BERTRAND G, ISHIYAMA N, NENQUIN M, RAVIER MA, HENQUIN JC (2002): The elevation of glutamate content and the amplification of insulin secretion in glucose-stimulated pancreatic islets are not causally related. *J Biol Chem* 277(36): 32883-32891
- BRÄNSTRÖM R, EFENDIĆ S, BERGGREN PO, LARSSON O (1998): Direct inhibition of the pancreatic beta-cell ATP-regulated potassium channel by alpha-ketoisocaproate. *J Biol Chem* 273(23): 14113-14118
- BROCKLEHURST KJ, PAYNE VA, DAVIES RA, CARROLL D, VERTIGAN HL, WIGHTMAN HJ, AISTON S, WADDELL ID, LEIGHTON B, COGHLAN MP, AGIUS L (2004): Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators. *Diabetes* 53(3): 535-541
- BROWN AM, KRISTAL BS, EFFRON MS, SHESTOPALOV AI, ULLUCCI PA, SHEU KF, BLASS JP, COOPER AJ (2000): Zn²⁺ inhibits alpha-ketoglutarate-stimulated mitochondrial respiration and the isolated alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. *J Biol Chem* 275(18): 13441-13447
- CHRISTENSEN HN, CULLEN AM (1969): Behavior in the rat of a transport-specific, bicyclic amino acid. Hypoglycemic action. *J Biol Chem* 244(6): 1521-1526
- CHRISTENSEN HN, HANDLOGTEN ME, LAM I, TAGER HS, ZAND R (1969): A bicyclic amino acid to improve discriminations among transport systems. *J Biol Chem* 244(6): 1510-1520

- CORKEY BE, DEENEY JT, YANEY GC, TORNHEIM K, PRENTKI M (2000): The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction. *J Nutr* 130(2S Suppl): 299S-304S
- CORKEY BE, MARTIN-REQUERO A, WALAJTYS-RODE E, WILLIAMS RJ, WILLIAMSON JR (1982): Regulation of the branched chain alpha-ketoacid pathway in liver. *J Biol Chem* 257(16): 9668-9676
- CURI R, CARPINELLI AR, MALAISSE WJ (1991): Hexose metabolism in pancreatic islets: pyruvate carboxylase activity. *Biochimie* 73(5): 583-586
- DEAN PM (1973): Ultrastructural morphometry of the pancreatic beta-cell. *Diabetologia* 9(2): 115-119
- DETIMARY P, GILON P, HENQUIN JC (1998): Interplay between cytoplasmic Ca^{2+} and the ATP/ADP ratio: a feedback control mechanism in mouse pancreatic islets. *Biochem J* 333 (Pt 2): 269-274
- DETIMARY P, VAN DEN BERGHE G, HENQUIN JC (1996): Concentration dependence and time course of the effects of glucose on adenine and guanine nucleotides in mouse pancreatic islets. *J Biol Chem* 271(34): 20559-20565
- EFANOV AM, BARRETT DG, BRENNER MB, BRIGGS SL, DELAUNOIS A, DURBIN JD, GIESE U, GUO H, RADLOFF M, GIL GS, SEWING S, WANG Y, WEICHERT A, ZALIANI A, GROMADA J (2005): A novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function. *Endocrinology* 146(9): 3696-3701
- ELIASSON L, RENSTROM E, AMMALA C, BERGGREN PO, BERTORELLO AM, BOKVIST K, CHIBALIN A, DEENEY JT, FLATT PR, GABEL J, GROMADA J, LARSSON O, LINDSTROM P, RHODES CJ, RORSMAN P (1996): PKC-dependent stimulation of exocytosis by sulfonylureas in pancreatic beta cells. *Science* 271(5250): 813-815
- ELMI A, IDAHL LA, SEHLIN J (2000): Relationships between the Na^+/K^+ pump and ATP and ADP content in mouse pancreatic islets: effects of meglitinide and glibenclamide. *Br J Pharmacol* 131(8): 1700-1706
- FAHIEN LA, MACDONALD MJ (2002): The succinate mechanism of insulin release. *Diabetes* 51(9): 2669-2676
- FUHLENDORFF J, RORSMAN P, KOFOD H, BRAND CL, ROLIN B, MACKAY P, SHYMKO R, CARR RD (1998): Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes. *Diabetes* 47(3): 345-351

- GRIMSBY J, SARABU R, CORBETT WL, HAYNES NE, BIZZARRO FT, COFFEY JW, GUERTIN KR, HILLIARD DW, KESTER RF, MAHANEY PE, MARCUS L, QI L, SPENCE CL, TENGI J, MAGNUSON MA, CHU CA, DVOROZNIAK MT, MATSCHINSKY FM, GRIPPO JF (2003): Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. *Science* 301(5631): 370-373
- GYLFE E (1976): Comparison of the effects of leucines, non-metabolizable leucine analogues and other insulin secretagogues on the activity of glutamate dehydrogenase. *Acta Diabetol Lat* 13(1-2): 20-24
- HÄRING HU, MATTHAEI S (2002): Diabetes mellitus Typ 2. *Diabetes und Stoffwechsel* 11 (Suppl. 2): 9-13
- HASTEDT K (2003): Mechanismus der K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Wirkung beta-zytotroper Nährstoffe und Interaktion neuer Sulfonylharnstoff-Analoga mit K_{ATP} -Kanälen. <http://opus.tu-bs.de/opus/volltexte/2003/372/>
- HEISSIG H, URBAN KA, HASTEDT K, ZÜNKLER BJ, PANTEN U (2005): Mechanism of the insulin-releasing action of alpha-ketoisocaproate and related alpha-keto acid anions. *Mol Pharmacol* 68(4): 1097-1105
- HELLMAN B (1967): Islet morphology and glucose metabolism in relation to the specific function of the pancreatic β cells. *Proc. 6th Congress of the Inst. Diab. Fed. Stockholm*
- HENQUIN JC (1987): Regulation of insulin release by ionic and electrical events in B cells. *Horm Res* 27(3): 168-178
- HENQUIN JC (2000): Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49(11): 1751-1760
- HENQUIN JC, RAVIER MA, NENQUIN M, JONAS JC, GILON P (2003): Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest* 33(9): 742-750
- HOLLANDER M, WOLFE DA (1999): Nonparametric statistical methods. *John Wiley & Sons, Inc., New York* 2nd ed.
- HUTSON SM, RANNELS SL (1985): Characterization of a mitochondrial transport system for branched chain alpha-keto acids. *J Biol Chem* 260(26): 14189-14193
- HUTSON SM, ROTEN S, KAPLAN RS (1990): Solubilization and functional reconstitution of the branched-chain alpha-keto acid transporter from rat heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(3): 1028-1031
- HUTTON JC, SENER A, MALAISSE WJ (1979): The metabolism of 4-methyl-2-oxopentanoate in rat pancreatic islets. *Biochem J* 184(2): 291-301

- LACY PE, KOSTIANOVSKY M (1967): Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16(1): 35-39
- LENZEN S (1978): Effects of alpha-ketocarboxylic acids and 4-pentenoic acid on insulin secretion from the perfused rat pancreas. *Biochem Pharmacol* 27(9): 1321-1324
- LENZEN S, RUSTENBECK I, PANTEN U (1984): Transamination of 3-phenylpyruvate in pancreatic B-cell mitochondria. *J Biol Chem* 259(4): 2043-2046
- LENZEN S, SCHMIDT W, PANTEN U (1985): Transamination of neutral amino acids and 2-keto acids in pancreatic B-cell mitochondria. *J Biol Chem* 260(23): 12629-12634
- LENZEN S, SCHMIDT W, RUSTENBECK I, PANTEN U (1986): 2-ketoglutarate generation in pancreatic B-cell mitochondria regulates insulin secretory action of amino acids and 2-keto acids. *Biosci Rep* 6(2): 163-169
- LERNMARK A (1974): The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 10(5): 431-438
- LETTO J, BROSNAN JT, BROSNAN ME (1990): Oxidation of 2-oxoisocaproate and 2-oxoisovalerate by the perfused rat heart. Interactions with fatty acid oxidation. *Biochem Cell Biol* 68(1): 260-265
- LIU YJ, CHENG H, DROUGHT H, MACDONALD MJ, SHARP GW, STRAUB SG (2003): Activation of the K_{ATP} channel-independent signaling pathway by the nonhydrolyzable analog of leucine, BCH. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(2): E380-E389
- LIU YQ, JETTON TL, LEAHY JL (2002): beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *J Biol Chem* 277(42): 39163-39168
- LÖFFLER G (1997a): Stoffwechsel der Kohlenhydrate. *Biochemie und Pathobiochemie*, Hrsg. Löffler G, Petrides PE, Springer-Verlag, Berlin 5. Aufl.: Kap. 15
- LÖFFLER G (1997b): Stoffwechsel der Lipide. *Biochemie und Pathobiochemie*, Hrsg. Löffler G, Petrides PE, Springer-Verlag, Berlin 5. Aufl.: Kap. 16
- LÖFFLER G (1997c): Der Citratcyclus. *Biochemie und Pathobiochemie*, Hrsg. Löffler G, Petrides PE, Springer-Verlag, Berlin 5. Aufl.: Kap. 17
- LÖFFLER G (1997d): Endokrine Gewebe II: Die schnelle Stoffwechselregulation. *Biochemie und Pathobiochemie*, Hrsg. Löffler G, Petrides PE, Springer-Verlag, Berlin 5. Aufl.: Kap. 28

- MACDONALD MJ (2002): Differences between mouse and rat pancreatic islets: succinate responsiveness, malic enzyme, and anaplerosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(2): E302-E310
- MACDONALD MJ, FAHIEN LA (2000): Glutamate is not a messenger in insulin secretion. *J Biol Chem* 275(44): 34025-34027
- MACDONALD MJ, FAHIEN LA, BROWN LJ, HASAN NM, BUSS JD, KENDRICK MA (2005): Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(1): E1-E15
- MACDONALD PE, SALAPATEK AM, WHEELER MB (2003): Temperature and redox state dependence of native Kv2.1 currents in rat pancreatic beta-cells. *J Physiol* 546(Pt 3): 647-653
- MAECHLER P, WOLLHEIM CB (1999): Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402(6762): 685-689
- MALAISSÉ WJ, MALAISSÉ-LAGAE F, SENER A (1982): The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: effect of aminooxyacetate upon nutrient-stimulated insulin secretion. *Endocrinology* 111(2): 392-397
- MALAISSÉ WJ, SENER A, MALAISSÉ-LAGAE F, HUTTON JC, CHRISTOPHE J (1981): The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Metabolic interaction of L-glutamine and 2-ketoisocaproate in pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta* 677(1): 39-49
- MALAISSÉ WJ, SENER A, WELSH M, MALAISSÉ-LAGAE F, HELLERSTROM C, CHRISTOPHE J (1983): Mechanism of 3-phenylpyruvate-induced insulin release. Metabolic aspects. *Biochem J* 210(3): 921-927
- MATSCHINSKY FM (1996): A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45(2): 223-241
- MATSCHINSKY FM, FERTEL R, KOTLER-BRAJTBURG J, STILLINGS S, ELLERMAN J, RAYBAUD F AND HOLOWACH-THURSTON J (1973): Factors governing the action of small calorogenic molecules on the islets of Langerhans. *Proceedings of the 8th Midwest Conference on Endocrinology and Metabolism*, eds. Breitenbach RP and Mussachia XJ, University of Missouri, Columbia, MO : 63-87
- MEIER JJ, NAUCK MA (2005): Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in biology and pathology. *Diabetes Metab Res Rev* 21(2): 91-117
- MEYER M, CHUDZIAK F, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M, PANTEN U (1999): Structural requirements of sulphonylureas and analogues for interaction with sulphonylurea receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 128(1): 27-34

- MOSKALEWSKI S (1965): Isolation and culture of the islets of langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol* 44: 342-353
- PANTEN U (1975): Effects of alpha-ketomonocarboxylic acids upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 291(4): 405-420
- PANTEN U (1987): Rapid control of Insulin secretion from pancreatic islets. *ISI Atlas of Science Pharmacol* Vol. 1: 307-310
- PANTEN U, BURGFELD J, GOERKE F, RENNICK M, SCHWANSTECHE M, WALLASCH A, ZÜNKLER BJ, LENZEN S (1989): Control of insulin secretion by sulfonylureas, meglitinide and diazoxide in relation to their binding to the sulfonylurea receptor in pancreatic islets. *Biochem Pharmacol* 38(8): 1217-1229
- PANTEN U, CHRISTIANS J (1973): Effect of 2-endo-aminonorborene-2-carboxylic acid upon insulin secretion and fluorescence of reduced pyridine nucleotides of isolated perfused pancreatic islets. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 276(1): 55-62
- PANTEN U, ISHIDA H, SCHAUDER P, FRERICHS H, HASSELBLATT A (1977): A versatile microperfusion system. *Anal Biochem* 82(2): 317-326
- PANTEN U, KLEIN H (1982): O₂ consumption by isolated pancreatic islets, as measured in a microincubation system with a Clark-type electrode. *Endocrinology* 111(5): 1595-1600
- PANTEN U, KRIEGSTEIN E, POSER W, SCHONBORN J, HASSELBLATT A (1972): Effects of L-leucine and alpha-ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS Lett* 20(2): 225-228
- PANTEN U, LANGER J (1981): Mechanism of 3-phenylpyruvate-induced insulin release from isolated pancreatic islets. *Biochem J* 198(2): 353-356
- PANTEN U, RUSTENBECK I (2005): Pharmakologie des Glucosestoffwechsels. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Hrsg. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, Verlag Urban & Fischer, München 9. Aufl: Kap. 27
- PANTEN U, SCHWANSTECHE M, WALLASCH A, LENZEN S (1988): Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 338(4): 459-462
- RODUIT R, NOLAN C, ALARCON C, MOORE P, BARBEAU A, DELGHINGARO-AUGUSTO V, PRZYBYKOWSKI E, MORIN J, MASSE F, MASSIE B, RUDERMAN N, RHODES C, POITOUT V, PRENTKI M (2004): A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and non-fuel stimuli. *Diabetes* 53(4): 1007-1019

- ROE MW, WORLEY JF 3RD, MITTAL AA, KUZNETSOV A, DASGUPTA S, MERTZ RJ, WITHERSPOON SM 3RD, BLAIR N, LANCASTER ME, MCINTYRE MS, SHEHEE WR, DUKES ID, PHILIPSON LH (1996): Expression and function of pancreatic beta-cell delayed rectifier K⁺ channels. Role in stimulus-secretion coupling. *J Biol Chem* 271(50): 32241-32246
- SATO Y, HENQUIN JC (1998): The K⁺-ATP channel-independent pathway of regulation of insulin secretion by glucose: in search of the underlying mechanism. *Diabetes* 47(11): 1713-1721
- SCHERBAUM WA (2001): Kohlenhydratstoffwechsel, Spezielle Pathophysiologie. *Klinische Pathophysiologie, Hrsg. Siegenthaler W, Georg Thieme Verlag, Stuttgart* 8. Aufl.: Kap. 2.3
- SCHMELING H (2004): Direkte Hemmung ATP-sensitiver Kaliumkanäle in der pankreatischen B-Zelle durch Monokarbonsäuren. <http://opus.tu-bs.de/opus/volltexte/2004/547/>
- SCHWANSTECHE M, SCHWANSTECHE C, DICKEL C, CHUDZIAK F, MOSHIRI A, PANTEN U (1994): Location of the sulphonylurea receptor at the cytoplasmic face of the beta-cell membrane. *Br J Pharmacol* 113(3): 903-911
- SEGHERS V, NAKAZAKI M, DEMAYO F, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J (2000): Sur1 knockout mice. A model for K_{ATP} channel-independent regulation of insulin secretion. *J Biol Chem* 275(13): 9270-9277
- SENER A, MALAISSE WJ (1980): L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* 288(5787): 187-189
- STRAUB SG, SHARP GW (2002): Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18(6): 451-463
- SU J, YU H, LENKA N, HESCHELER J, ULLRICH S (2001): The expression and regulation of depolarization-activated K⁺ channels in the insulin-secreting cell line INS-1. *Pflügers Arch* 442(1): 49-56
- SZOKE E, GERICH JE (2005): Role of impaired insulin secretion and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Compr Ther* 31(2): 106-112
- THEWS G, MUTSCHLER E, VAUPEL P (1999): Pankreashormone und Blutzuckerregulation. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart* 5. Aufl.: Kap.16.7
- URBAN KA, PANTEN U (2005): Selective loss of glucose-induced amplification of insulin secretion in pancreatic islets pre-treated with sulfonylurea in the absence of fuels. *Diabetologia* 48(12): 2563-2566

-
- WARNOTTE C, GILON P, NENQUIN M, HENQUIN JC (1994): Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells. *Diabetes* 43(5): 703-711
- WHITE CW, RASHED HM, PATEL TB (1988): Sulfonylureas inhibit metabolic flux through rat liver pyruvate carboxylase reaction. *J Pharmacol Exp Ther* 246(3): 971-974
- WOLLHEIM CB (2000): Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in type II diabetes. *Diabetologia* 43(3): 265-277
- YANEY GC, CORKEY BE (2003): Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46(10): 1297-1312
- ZÜNKLER BJ, LENZEN S, MÄNNER K, PANTEN U, TRUBE G (1988): Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP-regulated K⁺ currents in pancreatic B-cells. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337(2): 225-230

8 ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
AOA	Aminooxyessigsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCH	2-Aminobicyclo[2.2.1]heptan-2-carbonsäure
BCKADH	branched-chain keto acid dehydrogenase
bidest.	bidestillata
CoA-SH	Coenzym A, reduzierte Form
CPT 1	Carnitin-Palmitoyltransferase 1
D-600	(±)-Methoxyverapamil-Hydrochlorid
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FADH ₂	Flavinadenindinucleotid, reduzierte Form
GLP-1	Glucagon-like-peptide-1
GluDH	Glutamat-Dehydrogenase
GLUT-2	Glucosetransporter, Subtyp 2
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
K _{ATP} -Kanal	ATP-abhängiger Kalium-Kanal
KC	α-Ketocaprinsäure, 2-Oxohexansäure (diese Abkürzung wurde auch für das Anion verwendet)
KGDH	α-Ketoglutarat-Dehydrogenase
KIC	α-Ketoisocaprinsäure, 4-Methyl-2-oxopentansäure (diese Abkürzung wurde auch für das Anion verwendet)
K _{IR6.2}	einwärtsgerichteter (inward rectifier) Kalium-Kanal, Subtyp 6.2
KIV	α-Ketoisovaleriansäure, 3-Methyl-2-oxobutansäure (diese Abkürzung wurde auch für das Anion verwendet)
K _m	Michaelis-Konstante
KRHA	Krebs-Ringer-HEPES-Albumin-Medium
KV	α-Ketovaleriansäure, 2-Oxopentansäure (diese Abkürzung wurde auch für das Anion verwendet)

MMS	Monomethylsuccinat, Bernsteinsäure-Monomethylester (diese Abkürzung wurde auch für das Anion verwendet)
n-C	n-Caprinsäure, n-Hexansäure (diese Abkürzung wurde auch für das Anion verwendet)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduzierte Form
NaPyr	Natriumpyruvat
NMRI	Naval medical research institute (USA)
p. a.	pro analysi
PC	Pyruvat-Carboxylase
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PP-Zellen	pankreatisches Polypeptid-produzierende Zellen
PP	β -Phenylpyruvat, Anion der β -Phenylbrenztraubensäure (2-Oxo-3-phenyl-propansäure)
PPAR γ	peroxisome proliferator activated receptor, Subtyp γ
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SUR1	Sulfonylharnstoff-Rezeptor, Subtyp 1
syn.	synonym
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol